

Avaliação toxicológica do ácido elágico em roedores

Toxicological evaluation of ellagic acid in rodents

Angela Márcia Selhorst e Silva Beserra^I
Maria do Carmo Souza^{II}
Edson Moleta Colodel^{III}
Iberê Ferreira da Silva Junior^{IV}
Joaquim Corsino da Silva Lima^V
Regilane Matos da Silva^{VI}
Domingos Tabajara de Oliveira Martins^{VII}

^I Farmacêutica, Mestre em Ciências da Saúde. UFMT, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil; UNIC, Faculdade de Farmácia, CEP: 78015-480, Cuiabá, MT, Brasil

^{II} Bióloga, Mestre em Ciências da Saúde, Colaboradora/Pesquisadora. UFMT, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

^{III} Médico Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Colaborador/Pesquisador. UFMT, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Departamento de Clínica Veterinária, CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

^{IV} Farmacêutico, Mestre em Ciências da Saúde, Colaborador/Pesquisador. UNIC, Faculdade de Farmácia, CEP: 78015-480, Cuiabá, MT, Brasil

^V Biólogo, Mestre em Saúde e Ambiente, Colaborador/Pesquisador. UFMT, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

^{VI} Farmacêutica, Doutora em Farmacologia, Colaborador/Pesquisador. UFMT, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

^{VII} Farmacêutico, Doutor em Ciências Biológicas, Docente/Pesquisador orientador. UFMT, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, CEP: 78060-900, Cuiabá, MT, Brasil

RESUMO - Este estudo objetivou avaliar a segurança do ácido elágico (AE), uma lactona fenólica de ocorrência vegetal, através de estudos de toxicidade aguda e subcrônica. No teste hipocrático, camundongos receberam AE v.o (25 a 1500 mg/kg) ou ip. (25 a 1000 mg/kg), sendo observados por 14 dias. Para determinação da DL₅₀, o AE foi administrado v.o (25 a 1500 mg/kg) ou ip. (25 a 1000 mg/kg) em camundongos, observando-se o número de animais mortos após 24h. A toxicidade subcrônica foi avaliada pela exposição única e diária de ratos ao veículo ou AE (10, 30 e 100 mg/kg v.o), e após 30 dias, coletou-se sangue para realização de exames hematológicos e bioquímicos, e alguns órgãos vitais para análises histopatológicas. No teste hipocrático, o AE tanto por v.o quanto por via ip., não provocou letalidade nos camundongos, e os sinais clínicos que surgiram foram discretos, reversíveis e observados apenas nas maiores doses. Por ausência de morte, a DL₅₀ não foi determinada. Na toxicidade subcrônica, o AE não alterou o perfil histológico dos órgãos analisados, nem os parâmetros hematológicos e bioquímicos, à exceção do ácido úrico que foi reduzido nas doses 30 e 100 mg/kg. Os estudos toxicológicos agudo e subcrônico pré-clínicos demonstraram que o AE possui toxicidade relativamente baixa.

Palavras-chave: Ácido elágico. Testes de Toxicidade. Ratos Wistar. Camundongos Swiss.

ABSTRACT - This work aimed to evaluate the safety of ellagic acid (EA), a phenolic lactone of vegetable origin, using acute and subchronic toxicity studies. In the Hippocratic test, mice received EA p.o. (25-1500 mg/kg) or ip. (25-1000 mg/kg) and were observed for 14 days. To determine the LD₅₀, EA was administered to mice p.o. (25-1500 mg/kg) or ip. (25-1000 mg/kg), and the number of deaths after 24 h was verified. Subchronic toxicity was evaluated in rats after a single exposure to vehicle or EA (10, 30 and 100 mg/kg p.o.) using hematological and biochemical exams that were performed on blood collected on day 30, as well as histopathological analyses of vital organs. In the Hippocratic test, EA administered p.o or ip. did not provoke death in mice; moreover, the signs that appeared were discrete, reversible and observed only at higher doses. Given that no deaths occurred, the LD₅₀ was not determined. As for the subchronic toxicity, EA altered neither the histological profile of the organs analyzed nor any other hematological or biochemical parameter except uric acid levels, which were reduced at doses of 30 and 100 mg/kg. Preclinical acute and subchronic toxicity studies demonstrated that EA possesses relatively low toxicity.

Keywords: Ellagic acid. Toxicity tests. Wistar rats. Swiss mice.

INTRODUÇÃO

O ácido elágico (AE) é uma lactona fenólica que ocorre principalmente em frutas como nozes, morango, framboesa, uvas e amoras (VATTEM & SHETTY, 2005) e em plantas medicinais como *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (SÓLON *et al.*, 2000; ROGÉRIO *et al.*, 2006 e 2008), *Punica granatum* L. (REDDY *et al.*, 2007; BELL & HAWTHORNE, 2008), *Duchesnea chrysantha* (Zoll. & Morritz.) Miq. (KIM *et al.*, 2008), *Ficus glomerata* Roxb (RAO *et al.*, 2008), *Juglans regia* L. (PAPOUTSI *et al.*, 2008) e *Pimenta dioica* (Merr.) L. (MARZOUK *et al.*, 2007). Encontra-se presente na forma de elagitaninos, como componente estrutural da membrana e parede celular vegetal (VATTEM & SHETTY, 2005).

A primeira publicação relacionada à atividade farmacológica do AE é de 1964, com o trabalho de RATNOFF & CRUM (1964) que descrevem a ativação do fator de Hageman pelo AE. Deste período até hoje, diversas propriedades biológicas têm sido descritas para o AE: anticarcinogênica e antimutagênica (AGGARWAL & SHISHODIA, 2006); antioxidante (SUDHEER *et al.*, 2007; DEVIPRIYA *et al.*, 2007a,b); antiinflamatória (ROGÉRIO *et al.*, 2006 e 2008; YU *et al.*, 2007; PAPOUTSI *et al.*, 2008); antiulcerogênica e gastroprotetora (IINO *et al.*, 2001 e 2002); antimicrobiana (VATTEM & SHETTY, 2005); inibidora da síntese de tromboxano B₂ (MURAKAMI, 1991); hepatoprotetora (VATTEM & SHETTY, 2005); anti-aterosclerótico (YU *et al.*, 2007); e inibidora da DNA topoisomerase (VATTEM & SHETTY, 2005).

Apesar de ser utilizado como suplemento alimentar no Japão, por suas propriedades antioxidantes (MHLW, 1996), a avaliação da segurança desta substância só recentemente foi investigada, porém em ratos F344/DuCrj, em doses elevadas e misturado à ração (TASAKI *et al.*, 2008). Antes do estudo de TASAKI *et al.* (2008), DAMAS *et al.* (1987) relataram efeitos coagulantes, bem como congestão dos

linfonodos e baço após administração intravenosa de AE (30 mg/kg) e CHEN & CHUNG (2000) demonstraram a ausência de mutagenicidade em ratos.

O objetivo desse estudo foi avaliar a segurança do AE, em modelos de toxicidade aguda e subcrônica, administrando-o por gavagem, em camundongos Swiss Webster e ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão da Literatura

As fontes utilizadas para construção da revisão da literatura foram obtidas no Medline e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), empregando os termos ellagic acid e ácido elágico.

Animais

Foram usados ratos *Rattus norvegicus*, variedade Wistar (180-200 g) e camundongos *Mus musculus*, variedade Swiss Webster (25-30 g), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Brasil. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno a 22 ± 2°C, com ciclos controlados de claro/escuro de 12 h, com livre acesso à ração padrão Purina® e água *ad libitum*. O protocolo para esse estudo foi concebido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMT sob o nº 23108.005522/08-05.

Teste Hipocrático

Camundongos machos (n=3/grupo) foram tratados por gavagem (via oral - v.o.) com AE (Sigma, USA), nas doses de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 e 1500 mg/kg e por via intraperitoneal (ip.), nas doses de 25, 50, 100, 250, 500 e 1000

mg/kg. Um animal controle, para cada grupo, recebeu água destilada (10 mL/kg). Os animais foram observados individualmente, em gaiolas apropriadas (campo aberto), nos tempos 0, 15 e 30 min; 1, 2, 4 e 8 h e, uma vez, ao dia, por 14 dias. Os resultados das observações comportamentais gerais foram anotados em tabela adaptada do trabalho de MALONE (1983).

Dose Letal Mediana (DL₅₀)

Para a determinação da DL₅₀ foi utilizado o método de MILLER & TAINTER (1944). O AE foi administrado nas doses de 100, 250, 500, 1000 e 1500 mg/kg, v.o., num volume de 0,1 mL/10g de peso corpóreo, em grupos de 10 camundongos cada (5 machos e 5 fêmeas), privados de alimentos por toda noite e com livre acesso a água até 1 hora antes do experimento. Decorridas 24 h, foi contado o número de animais mortos, expressos em termos percentuais e transformados em probitos.

Toxicidade Subcrônica

A toxicidade subcrônica foi avaliada através da exposição única e diária de ratos machos ao veículo (água destilada, 1 mL/100g, v.o.) ou AE (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), por um período de 30 dias, conforme proposto por CHAN *et al.* (1982). Os animais (n=6/grupo) foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais para controle do consumo de água e ração e da excreção de fezes e urina. As fezes e urina excretadas, bem como o peso corporal e a quantidade ingerida de ração e água foram determinados a cada três dias, sendo o volume do tratamento ajustado conforme a alteração média dos pesos. Cada um destes parâmetros foi obtido a cada três dias, mas para as análises estatísticas foram agrupados de 6 em 6 dias e expressos como D₀, D₆, D₁₂, D₁₈, D₂₄ e D₃₀. Quaisquer sinais de toxicidade, como alterações da pele, pêlos, mucosas e olhos, sistemas circulatório, gastrointestinal, respiratório, nervoso central e periférico, atividade somatomotriz e manifestações comportamentais em geral, foram registradas.

Ao final do período, os animais foram anestesiados pela inalação de éter etílico, o sangue coletado a vácuo, por punção da veia cava caudal e encaminhados para realização de análises hematológicas e bioquímicas.

Análises hematológicas

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos Vacutainer® com EDTA e as análises hematológicas [hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), hemácias totais, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos totais, bastonetes, neutrófilo, linfócito, eosinófilo, monócito e plaquetas] realizadas em contador automatizado (Cell Dyn 3700, Abott Laboratories) de acordo com KJELDSBERG (1998).

Análises bioquímicas

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubos Vacutainer® sem anticoagulante e com gel separador e ativador de coágulo para obtenção do soro. Após centrifugação, o soro foi analisado [glicose, uréia, creatinina, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, colesterol, triglicérides, proteínas totais e albumina] empregando kits bioquímicos da Labtest (HENRY, 1991).

Análises histopatológicas

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados com sobredose de éter etílico, os órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago, baço e rins) retirados, necropsiados, pesados para determinação do peso relativo [(peso do órgão/peso corporal) x 100], armazenados em formol 10%, incluídos em parafina, cortados e processados para confecção das lâminas e corados pela hematoxilina e eosina, para exames ao microscópio óptico (PEARSE, 1968).

Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos em termos de Média ± E.P.M. As comparações entre as médias foram realizadas através da ANOVA uma via, seguida do pós-teste de Student-Newman-Keuls ou Dunnett. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas por software estatístico (GraphPad Instat®).

RESULTADOS

Teste Hipocrático

A administração oral e única do AE nas doses de 25 a 250 mg/kg não produziu alterações comportamentais em camundongos. Com doses de 500 e 1000 mg/kg (v.o.) verificou-se apenas diminuição da micção, adicionando de discreta analgesia, hiperemia da orelha e reação de fuga com 1500 mg/kg. Pela via ip., o AE, nas doses de 25 a 500 mg/kg, não produziu alterações comportamentais em camundongos. Com 1000 mg/kg (ip.) verificou-se perdas de peso e da apreensão da pata, discreta analgesia e diarreia, todos reversíveis em até 8 h (Tabela 1).

Não houve letalidade dos animais em nenhuma das vias de administração e doses testadas (Tabela 1).

Não foi possível determinar a DL₅₀ nos animais, por ausência de morte dos animais nas doses máximas possíveis de serem administradas por via oral ou intraperitoneal.

Toxicidade Subcrônica

Os efeitos do tratamento diário com veículo ou AE (10, 30 e 100 mg/kg, v.o) durante 30 dias, em ratos, sobre o

Tabela 1. Efeitos da administração do ácido elágico sobre as atividades comportamentais gerais em camundongos.

Via	Grupo	Dose ^a (mg/kg)	Efeitos Comportamentais ^b	Mortes
v.o.	Veículo	---	Sem alterações	0/7
	Ácido Elágico	25	Sem alterações	0/3
		50	Sem alterações	0/3
		100	Sem alterações	0/3
		250	Sem alterações	0/3
		500	Diminuição da micção	0/3
		1000	Maior intensidade dos efeitos anteriores	0/3
1500	Maior intensidade dos efeitos anteriores e discreta analgesia; hiperemia da orelha; reação de fuga.	0/3		
ip.	Veículo	---	Sem alterações	0/6
	Ácido Elágico	25	Sem alterações	0/3
		50	Sem alterações	0/3
		100	Sem alterações	0/3
		250	Sem alterações	0/3
		500	Sem alterações	0/3
		1000	Perda de peso; discreta analgesia; perda da apreensão da pata; diarreia.	0/3

^a Dose única, aguda. ^b Observados por 14 dias.
Dose Letal Mediana (DL50)

ganho de peso acumulado, consumo de ração e água, e excreção de fezes são vistos na Tabela 2. Não foi verificada diferença no ganho de peso acumulado (g) no período de D₀ a D₂₄, nos ratos tratados com AE nas doses administradas. O ganho de peso acumulado (g) no D₃₀ nos animais tratados com 10 e 30 mg/kg de AE foi menor (135,3 ± 8,4 g e 132,2 ± 12,3 g, p<0,05, respectivamente) do que no grupo controle (158,8 ± 5,9 g), não ocorrendo o mesmo com os animais tratados com AE na dose de 100 mg/kg (160,5 ± 4,9 g). Não houve diferença no consumo de água no período de D₀ a D₃₀, exceto no D₂₄ que foi menor nos animais tratados com AE nas doses de 10 (59,5±2,7 mL, p<0,01), 30 (68,3±2,6 mL, p<0,05) e 100 mg/kg (64,0±3,8 mL, p<0,05), em comparação ao veículo (77,8±6,1 mL). Quanto ao consumo de ração e as excreções de fezes e urina, não foram verificadas alterações significantes destes parâmetros pela administração do AE.

A Tabela 3 mostra o efeito do tratamento subcrônico dos ratos com AE (10, 20 e 100 mg/kg v.o.) nos parâmetros bioquímicos séricos. O AE nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg não alterou os níveis plasmáticos de glicose, uréia, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina, colesterol total, triglicérides, proteínas totais e albumina. No entanto, os níveis plasmáticos de ácido úrico foram reduzidos nas doses de 30 e 100 mg/kg v.o. (0,26±0,04 e 0,41 ± 0,06 mg/dL, p<0,001, respectivamente) em comparação ao grupo veículo (1,34±0,11 mg/dL).

A administração do AE (10, 30 e 100 mg/Kg v.o.) não alterou significativamente nenhum dos parâmetros hematólogicos analisados (Tabela 4), em comparação ao grupo que recebeu veículo.

Nenhuma alteração macroscópica foi observada no coração, pulmão, fígado, estômago, baço e rins e não se observou diferença significativa sobre os índices de pesos relativos (%) destes órgãos nos animais tratados com AE, quando comparado ao grupo veículo (Tabela 5).

No exame histopatológico, tanto os animais tratados com veículo quanto com AE (10, 30 e 100 mg/kg) apresentaram edema pulmonar multifocal, com infiltrado linfocitário peribronquiolar. Nos demais órgãos (coração, fígado, estômago, baço e rins) não foram observadas alterações histológicas significativas nos animais que receberam AE.

DISCUSSÃO

Há um crescente interesse no entendimento do papel e mecanismo de alguns fitofármacos, como polifenóis, flavonóides e fenilpropanóides, como inibidores do estresse oxidativo (DEVIPRIYA *et al.*, 2007a,b). Entre todos esses fitofármacos, o AE tem recebido uma maior atenção por causa de suas diversas propriedades biológicas e farmacológicas na prevenção e terapia de muitas doenças, incluindo câncer e aterosclerose (DEVIPRIYA *et al.*, 2007a,b). O AE é um fitofármaco de interesse principalmente do ponto de vista nutricional já que é encontrado abundantemente em nozes e frutas como morango, framboesa, uvas e amoras (MURAKAMI *et al.*, 1991; VATTEM & SHETTY, 2005), e não há dúvidas de que a avaliação toxicológica do AE é um tema de importante relevância.

No teste hipocrático, o AE tanto por v.o quanto por via i.p, mostrou possuir baixa toxicidade, uma vez que nenhuma dose testada provocou letalidade nos camundongos no período de 14 dias de observação, e os sinais clínicos que surgiram foram discretos, reversíveis e observados apenas nas maiores doses.

Utilizando doses muito maiores que as utilizadas nesse estudo, TASAKI *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade

Tabela 2. Efeito da administração oral subcrônica do ácido elágico sobre o peso corporal, ganho de peso acumulado, consumo de água e ração, excreção de fezes e urina.

Parâmetro Analisado	Período de Tratamento (dias)					
	D ₀	D ₆	D ₁₂	D ₁₈	D ₂₄	D ₃₀
Controle (Veículo)						
Peso Corporal (g)	169,9 ± 4,6	204,4 ± 5,7	248,7 ± 4,7	282,6 ± 5,3	304,7 ± 5,7	328,9 ± 8,6
Ganho de peso acumulado (g)	-	34,4 ± 1,4	78,7 ± 1,5	112,5 ± 2,5	134,7 ± 4,5	158,8 ± 5,9
Consumo Água (mL)	-	57,8 ± 3,9	65,0 ± 4,6	59,2 ± 3,6	77,8 ± 6,1	60,5 ± 2,6
Consumo Ração (g)	-	38,3 ± 1,5	45,2 ± 1,0	42,7 ± 1,2	46,8 ± 1,1	45,7 ± 1,3
Fezes (g)	-	21,3 ± 0,8	24,1 ± 1,3	21,6 ± 0,9	24,3 ± 1,5	24,7 ± 0,4
Urina (mL)	-	16,6 ± 1,2	22,0 ± 2,2	21,3 ± 1,3	25,5 ± 2,6	24,0 ± 1,0
Ácido elágico 10 mg/kg						
Peso Corporal (g)	169,2 ± 3,1	198,6 ± 3,6	233,2 ± 5,9	264,5 ± 8,6	285,5 ± 7,5	303,6 ± 7,8**
Ganho de peso acumulado (g)	-	29,5 ± 3,5	64,1 ± 6,4	95,4 ± 9,1	116,4 ± 7,5	135,3 ± 8,4Ω
Consumo Água (mL)	-	50,0 ± 3,3	54,0 ± 3,5	50,3 ± 1,8	59,5 ± 2,7Jj	51,6 ± 1,7
Consumo Ração (g)	-	35,6 ± 1,8	39,9 ± 1,8	41,6 ± 0,9	43,8 ± 0,8	40,9 ± 0,6
Fezes (g)	-	18,2 ± 1,0	22,3 ± 1,2	22,1 ± 0,9	21,6 ± 1,0	22,4 ± 1,0
Urina (mL)	-	16,3 ± 0,8	20,2 ± 1,2	19,2 ± 1,4	20,5 ± 1,2	20,6 ± 1,2
Ácido elágico 30 mg/kg						
Peso Corporal (g)	167,3 ± 4,9	197,3 ± 3,6	232,5 ± 3,3	265,3 ± 4,2	285,7 ± 6,6	299,5 ± 8,6**
Ganho de peso acumulado (g)	-	30,3 ± 1,4	63,3 ± 5,4	98,0 ± 7,7	118,4 ± 9,7	132,2 ± 12,3Ω
Consumo Água (mL)	-	50,2 ± 1,5	54,8 ± 2,5	56,3 ± 2,4	68,3 ± 2,6§	46,6 ± 3,5
Consumo Ração (g)	-	36,0 ± 0,6	39,5 ± 1,5	43,5 ± 1,2	45,0 ± 0,8	39,8 ± 2,1
Fezes (g)	-	19,9 ± 0,9	21,9 ± 0,8	22,9 ± 0,8	24,1 ± 0,4	22,6 ± 1,4
Urina (mL)	-	17,6 ± 1,6	21,6 ± 1,8	22,0 ± 1,1	23,2 ± 1,4	22,3 ± 1,2
Ácido elágico 100 mg/kg						
Peso Corporal (g)	161,4 ± 1,9	196,4 ± 2,5	239,8 ± 3,2	276,9 ± 3,7	301,5 ± 5,2	325,7 ± 4,8
Ganho de peso acumulado (g)	-	34,6 ± 1,0	77,5 ± 1,5	113,0 ± 3,3	137,3 ± 4,2	160,5 ± 4,9
Consumo Água (mL)	-	55,8 ± 2,0	58,6 ± 2,3	55,6 ± 4,3	64,0 ± 3,8§	55,5 ± 4,6
Consumo Ração (g)	-	39,4 ± 1,1	44,2 ± 1,1	44,9 ± 1,8	45,2 ± 1,1	44,7 ± 1,3
Fezes (g)	-	21,9 ± 1,2	22,9 ± 1,3	22,8 ± 1,1	24,5 ± 1,4	25,0 ± 0,9
Urina (mL)	-	19,0 ± 1,3	24,0 ± 0,7	23,6 ± 1,5	26,8 ± 2,7	27,2 ± 2,7

Os valores representam a Média ± E.P.M (n = 6/grupo). ANOVA uma via, seguida do teste de Student Newman-Keuls. **: p<0,01 vs. Controle (D30); Ω: p<0,05 vs. Controle (D30); Jj: p<0,01 vs. Controle (D24); §: p<0,05 vs. Controle(D24).

subcrônica do AE no período de 90 dias em ratos machos (727, 1469 e 3011 mg/kg/dia) e fêmeas (778, 1550 e 3254 mg/kg/dia) da cepa F344/DuCrj, administrando-o junto à ração. Os ratos machos não apresentaram nenhuma alteração indicativa de toxicidade, enquanto as fêmeas tiveram perda de peso corporal (TASAKI *et al.*, 2008). No presente estudo de toxicidade subcrônica, realizado em ratos Wistar machos, por 30 dias, o consumo de ração e as excreções de fezes e urina não foram alteradas pela administração de AE por gavagem. Já o ganho de peso nos animais tratados oralmente com AE nas doses de 10 e 30 mg/kg, foi menor que no grupo controle. Recentemente, LEI *et al.* (2007) demonstraram que o extrato da folha da romã

(*Punica granatum* L.), que contém altas concentrações de AE, diminui o desenvolvimento de obesidade e hiperlipidemia em camundongos tratados com dieta rica em gordura, possivelmente por sua ação inibitória *in vitro* sobre a atividade da lipase pancreática.

Os parâmetros hematológicos analisados e os níveis séricos de glicose, uréia, creatinina, AST, ALT, fosfatase alcalina, colesterol total, triglicérides, proteínas totais e albumina não foram alterados nos animais tratados com o AE, resultado semelhante ao encontrado no estudo de TASAKI *et al.* (2008) que observaram alterações esporádicas no VCM, AST e fosfatase alcalina, que foram interpretadas como não relacionadas ao tratamento.

Tabela 3. Efeito da administração oral subcrônica do ácido elágico por 30 dias sobre alguns parâmetros bioquímicos.

Parâmetro	Veículo	Ácido Elágico (mg/kg)		
		10	30	100
Glicose (mg/dL)	120,5 ± 8,34	107,8 ± 6,01	136,7 ± 3,93	134,7 ± 4,99
Uréia (mg/dL)	40,6 ± 2,36	51,0 ± 4,82	50,0 ± 3,58	55,5 ± 3,65
Creatinina (mg/dL)	0,98 ± 0,05	0,93 ± 0,05	0,82 ± 0,05	0,85 ± 0,04
Ác.Úrico (mg/dL)	1,34 ± 0,11	0,89 ± 0,21	0,26 ± 0,04***	0,41 ± 0,06***
AST (IU/l)	85,2 ± 3,57	90,0 ± 4,63	80,5 ± 7,79	66,17 ± 3,99
ALT (IU/l)	39,3 ± 1,73	44,5 ± 2,51	36,3 ± 2,59	36,00 ± 2,77
Fosf. Alcalina (IU/l)	166,7 ± 9,27	154,3 ± 12,4	124,8 ± 16,1	125,8 ± 9,99
Colesterol Tot. (mg/dL)	76,8 ± 5,60	80,6 ± 6,49	92,2 ± 5,51	86,6 ± 10,6
Triglicérides (mg/dL)	123,1 ± 13,3	197,3 ± 8,36	99,8 ± 17,4	119,5 ± 13,2
Proteínas Tot. (mg/dL)	7,47 ± 0,18	7,09 ± 0,44	7,30 ± 0,09	7,34 ± 0,15
Albumina (g/dL)	2,98 ± 0,02	2,99 ± 0,03	2,78 ± 0,04	2,86 ± 0,10

Os valores representam a Média ± E.P.M. (n = 6/grupo). ANOVA uma via, seguida do teste de Dunnet.

*** $p < 0,001$ vs veículo.

Tabela 4. Efeito da administração oral subcrônica do ácido elágico por 30 dias sobre alguns parâmetros hematológicos.

Parâmetro	Veículo	Ácido Elágico (mg/kg)		
		10	30	100
Hemáceas (106/mm ³)	6,65 ± 0,18	6,65 ± 0,14	6,76 ± 0,15	6,39 ± 0,23
Hemoglobina (g/dL)	14,9 ± 0,25	15,0 ± 0,17	14,7 ± 0,20	14,6 ± 0,25
Hematócrito (%)	37,7 ± 1,37	36,8 ± 0,89	37,4 ± 1,08	39,5 ± 2,55
VCM (fl)	56,8 ± 1,02	55,2 ± 0,37	55,3 ± 0,65	56,7 ± 0,64
HCM (pg)	22,1 ± 0,58	22,0 ± 0,71	21,3 ± 0,29	21,7 ± 0,66
CHCM (%)	39,0 ± 1,07	39,9 ± 1,32	38,6 ± 0,66	38,3 ± 0,86
Plaquetas (103/mm ³)	628 ± 44,9	818 ± 41,3	677 ± 70,5	748 ± 72,4
Leucócito tot. (103/mm ³)	8,90 ± 0,66	8,00 ± 0,72	10,5 ± 2,11	8,10 ± 0,64
Segmentado				
Relativo (%)	21,6 ± 2,32	27,4 ± 5,15	31,4 ± 3,93	29,4 ± 2,38
Absoluto (103/mm ³)	1,93 ± 0,28	2,21 ± 0,44	3,12 ± 0,64	2,39 ± 0,33
Linfócito				
Relativo (%)	76,8 ± 2,92	69,8 ± 5,25	65,0 ± 3,61	68,8 ± 2,73
Absoluto (103/mm ³)	6,82 ± 0,54	5,57 ± 0,66	6,89 ± 1,45	5,52 ± 0,44
Eosinófilo				
Relativo (%)	1,60 ± 0,68	2,80 ± 0,58	3,20 ± 1,02	1,80 ± 0,37
Absoluto (103/mm ³)	0,15 ± 0,06	0,22 ± 0,05	0,38 ± 0,18	0,15 ± 0,04

Os valores representam a Média ± E.P.M. (n = 6/grupo). ANOVA uma via.

Os níveis séricos de ácido úrico (mg/dL) foram reduzidos com AE, resultado inédito já que TASAKI *et al.* (2008) não dosaram este metabólito. A produção excessiva e/ou a baixa excreção de ácido úrico provocam um estado patológico chamado de gota (BORGES *et al.*, 2002). Na presença de oxigênio molecular, a enzima xantina oxidase catalisa a oxidação da hipoxantina a xantina e esta à ácido úrico (BORGES *et al.*, 2002). HATANO *et al.* (1990) e SÓLON *et al.* (2000) demonstraram, em ensaios *in vitro*, que o

AE é capaz de inibir a xantina oxidase. Nossos resultados mostram que o AE reduz os níveis séricos de ácido úrico, em ratos, possivelmente pela inibição da xantina oxidase.

Histopatologicamente, o edema pulmonar multifocal com infiltrado linfocitário peribronquiolar encontrado nos pulmões de ratos deve-se possivelmente às condições inadequadas do ar inspirado por estes animais, já que estas alterações foram encontradas em todos os animais, tratados ou não com AE. Nenhuma alteração macroscópica e

Tabela 5. Efeito da administração oral subcrônica do ácido elágico sobre o peso relativo do coração, pulmão, fígado, estômago, baço e rins ao final de 30 dias.

Órgãos	Veículo	Ácido Elágico (mg/kg)		
		10	30	100
Coração	0,39 ± 0,006	0,39 ± 0,018	0,37 ± 0,016	0,35 ± 0,005
Pulmão	0,62 ± 0,018	0,67 ± 0,059	0,59 ± 0,027	0,65 ± 0,056
Fígado	3,12 ± 0,081	3,07 ± 0,074	3,43 ± 0,133	3,29 ± 0,084
Estômago	0,56 ± 0,028	0,55 ± 0,021	0,53 ± 0,034	0,50 ± 0,015
Baço	0,22 ± 0,029	0,23 ± 0,008	0,23 ± 0,010	0,22 ± 0,011
Rim D	0,38 ± 0,010	0,38 ± 0,014	0,41 ± 0,005	0,39 ± 0,013
Rim E	0,38 ± 0,013	0,38 ± 0,013	0,40 ± 0,011	0,38 ± 0,008

^a Peso relativo (peso órgão/peso corporal x 100). Os valores representam a Média ± E.P.M. (n=6/grupo) ANOVA uma via.

histopatológica foi observada nos outros órgãos avaliados. TASAKI *et al.* (2008) encontraram também alterações histológicas semelhantes nos pulmões, coração, fígado e rins. Porém, tais lesões ocorrem espontaneamente em ratos F344/DuCrj (GREAVES & FACCINI, 1992), portanto essas alterações não foram relacionadas ao tratamento com AE.

Os estudos toxicológicos agudo em camundongos Swiss Webster e subcrônico pré-clínico, em ratos Wistar, demonstraram que o AE não causa alterações importantes de

toxicidade dentro do intervalo de doses utilizado. A redução do ácido úrico sérico pelo AE sugere um potencial deste composto no tratamento da gota, necessitando, no entanto, de estudos adicionais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPEMAT (proc. n° 002.0123/2007) e CPP (Centro de Pesquisa do Pantanal), pela bolsa e apoio financeiro concedidos.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B.B. & SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.*, 71(10): 1397-1421, 2006.
- BELL, C. & HAWTHORNE, S. Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer. A mini review. *J. Pharm. Pharmacol.*, 60(2): 139-144, 2008.
- BORGES, F.; FERNANDES, E. & ROLEIRA, F. Progress Towards the Discovery of Xanthine Oxidase Inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 9(2): 195-217, 2002.
- CHAN, P.K.; OHARA, G.P. & HAYES, A.W. Principles and methods for acute and subchronic toxicity. In: Hayes, A.W. *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press, 1982, p.1-51.
- CHEN, S.C. & CHUNG, K.T. Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds. *Food Chem. Toxicol.*, 38(1): 1-5, 2000.
- DAMAS, J.; ADAM, A.; REMACLE-VOLON, G. & GREK, V. Studies on the vascular and hematological changes induced by ellagic acid in rats. *Agents and Actions*, 22(3/4): 270-279, 1987.
- DEVIPRIYA, N.; SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A.R. & MENON, V.P. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. *Singapore Med. J.*, 48(4): 311-318, 2007a.
- DEVIPRIYA, N.; SUDHEER, A.R. & MENON, V.P. Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 21(6): 621-630, 2007b.
- GREAVES, P. & FACCINI, J.M. 1992 *Apud* TASAKI, M.; UMEMURA, T.; MAEDA, M., *et al.* Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46(3): 1119-24, 2008.

- HATANO, T.; YASUHARA, T.; YOSHIHARA, R., et al. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VII. Inhibitory effects of tannins related polyphenols on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.*, 38(5): 1224–1229, 1990.
- HENRY, J.B. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 18.ed. New York: W.B. Sanders Company, 1991. p. 141-142.
- IINO, T.; NAKAHARA, K.; MIKI, W., et al. Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol. Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. *Digestion*, 64(4): 214-221, 2001.
- IINO, T.; TASHIMA, K.; UMEDA, M., et al. Effect of ellagic acid on gastric damage induced in ischemic rat stomachs following ammonia or reperfusion. *Life Sci.*, 70(10): 1139-1150, 2002.
- KJELDSBERG, C.R. Princípios do exame hematológico. In: LEE, G.R.; BITHHELL, T.C.; FOERSTER, J.; et al. *Wintrobe hematologia clínica*. São Paulo: Manole, 1998. v.1, p. 7-42.
- KIM, J.M.; JANG, D.S.; LEE, Y.M., et al. Aldose-reductase- and protein glycation-inhibitory principles from the whole plant of *Duchesnea chrysantha*. *Chem. Biodiversity*, 5(2): 352-356, 2008.
- LEI, F.; ZHANG, X.N.; WANG, W., et al. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Obes.*, 31: 1023-1029, 2007.
- MALONE, M.H. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J. Ethnopharmacol.*, 8(2): 127-147, 1983.
- MARZOUK, M.S.; MOHARRAM, F.A.; MOHAMED, M.A., et al. Anticancer and antioxidant tannins from *Pimenta dioica* leaves. *Z. Naturforsch.*, 62(c): 526-536, 2007.
- MHLW (Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan). List of existing food additives. Notification No. 120 of the Ministry of Health en Welfare. Japan, 1996.
- MILLER, L.C. & TAINTER, M.L. Estimation of the ED₅₀ and it's error by means of logarithmic-probit graph paper. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 57: 261-264, 1944.
- MURAKAMI, S.; ISOBE, Y.; KIJIMA, H., et al. Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by ellagic acid. *Planta Med.*, 57: 305-308, 1991.
- PAPOUTSI, Z.; KASSI, E.; CHINOUI, I., et al. Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. *Br. J. Nutr.*, 99(4): 715-722, 2008.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry*. London: Churchill, 1968. v.2, p.1-26.
- RAO, C.V.; VERMA, A.R.; VIJAYAKUMAR, M. & RASTOGI, S. Gastroprotective effect of standardized extract of *Ficus glomerata* fruit on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 115(2): 323-326, 2008.
- RATNOFF, O.D. & CRUM, J.D. Activation of Hageman factor by solutions of ellagic acid. *J. Lab. Clin. Med.*, 63: 359-77, 1964.
- REDDY, M.K.; GUPTA, S.K.; JACOB, M.R., et al. Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L. *Planta Med.*, 73(5): 461-467, 2007.
- ROGERIO, A.P.; FONTANARI, C.; MELO, M.C., et al. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. *J. Pharm. Pharmacol.*, 58(9): 1265-1273, 2006.
- ROGERIO, A.P.; FONTANARI, C.; BORDUCCHI, E., et al. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur. J. Pharmacol.*, 580(1-2): 262-270, 2008.
- SÓLON, S.; LOPES, L.; SOUZA, J.P.T. & SCMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J. Ethnopharmacol.*, 72(1-2): 173-178, 2000.

- SUDHEER, A.R.; MUTHUKUMARAN, S.; DEVIPRIYA, N. & MENON, V.P. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology*, 230(1): 11-21, 2007.
- TASAKI, M.; UMEMURA, T.; MAEDA, M., *et al.* Safety assessment of ellagic acid, a food additive, in a subchronic toxicity study using F344 rats. *Food Chem. Toxicol.*, 46(3): 1119-24, 2008.
- VATTEM, D.A. & SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. *J. Food Biochem.*, 29(3): 234-266, 2005.
- YU, Y.M.; WANG, Z.H.; LIU, C.H. & CHEN, C.S. Ellagic acid inhibits IL-1 β -induced cell adhesion molecule expression in human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Nutr.*, 97(4): 692-698, 2007.

Recebido em 13/10/2009
Revisado em 23/10/2009 e 14/12/2009
Aceito em 26/01/2010

Correspondência:

Angela Márcia Selhorst e Silva Beserra
angelaselhorst25@hotmail.com.br
UFMT, Faculdade de Ciências Médicas,
Departamento de Ciências Básicas em Saúde.
Av. Fernando Correa da Costa s/n,
Coxipó, CEP: 78060-900
Cuiabá, MT, Brasil