

## EFEITO TOXICOLÓGICO *IN VIVO* DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Arrabidaea pulchra* (CHAM.) SANDWICH

### TOXICOLOGICAL EFFECT *IN VIVO* OF EXTRACT HYDROALCOHOLIC OF *Arrabidaea pulchra* (CHAM.) SANDWICH

Mário Luan Silva<sup>1</sup>

Joseney Maia de Lima<sup>2</sup>

Silvia Catarina Salgado Oloris<sup>3</sup>

#### RESUMO

Da *A. pulchra*, foi isolado ácido ursólico com atividade tripanomisida, tendo desse gênero poucos relatos de estudos fitoquímicos. Para o estudo da toxicidade de *A. pulchra*, coletou-se o material vegetal na Flona de Açú-RN. O extrato foi obtido por meio de folhas decantadas em álcool e evaporado em rotavapor. No experimento, ratos *Wistar* machos foram distribuídos em: controle (n=5), que recebeu água destilada; G1 (n=5) recebeu extrato na dose 0,1g/kg p.v; G2 (n=5) recebeu extrato na dose 1g/kg p.v; G3 (n=5) recebeu extrato na dose 2,5g/kg p.v, via gavagem por 60 dias. No exame histopatológico de rins e fígado, não foram identificadas alterações dignas de nota. Os resultados da bioquímica foram: ALT (30 ± 13; 49 ± 18; 48 ± 8; 64 ± 75), AST (108 ± 28; 97 ± 25; 85 ± 10; 133 ± 110), ureia (62 ± 3; 50 ± 6; 73 ± 18; 51 ± 11), creatinina (0,5 ± 0,2; 0,6 ± 0,3; 0,6 ± 0,1; 0,4 ± 0,1), proteínas totais (5,4 ± 0,3; 5,4 ± 0,5; 5,1 ± 0,2; 6,5 ± 5) e glicose (199 ± 28; 212,8 ± 9,6; 208 ± 13; 213 ± 13), demonstrando ausência de toxicidade renal e hepática *in vivo*.

**Palavras-chave:** Toxicidade. Extrato de Planta. Fígado. Rim.

#### ABSTRACT

The *A. pulchra* was isolated ursolic acid with activity tripanomisida, having this kind are few reports of phytochemical. To study the toxicity of *A. pulchra*, was collected plant material in the Flona Acu - RN. The extract was obtained by leaf alcohol decanted and evaporated in a rotary evaporator. In the experiment male *Wistar* rats were divided into control (n = 5) received distilled water; G1 (n = 5) received extract at a dose of 0.1g / kg bw, G2 (n = 5) received extract at a dose 1g/kg pv, G3 (n = 5) received extract at a dose 2.5g / kg bw by gavage for 60 days. Histopathology of liver and kidney were not identified changes worth noting. The results of biochemistry were: ALT (30 ± 13; 49 ± 18; 48 ± 8; 64 ± 75), AST (108 ± 28; 97 ± 25; 85 ± 10; 133 ± 110), urea (62 ± 3; 50 ± 6; 73 ± 18; 51 ± 11), creatinine (0.5 ± 0.20; 0.6 ± 0.3; 0.6 ± 0.1; 0.4 ± 0.1), total protein (5.4 ± 0.3; 5.4 ± 0.5; 5.1 ± 0.2; 6.5 ± 5) and glucose (199 ± 28; 212.8 ± 9.6; 208 ± 13; 213 ± 13). Demonstrating the absence of renal and hepatic toxicity *in vivo*.

**Key words:** Toxicity. Plant extract. Liver. Kidney.

<sup>1</sup> Aluno do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. E-mail: marioluan@oi.com.br

<sup>2</sup> Aluno do Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

<sup>3</sup> Doutora em Ciências e Professora da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

## 1 INTRODUÇÃO

A Caatinga ocupa uma área de 73,478 Km<sup>2</sup> e é o único bioma exclusivamente brasileiro. Do ponto de vista vegetacional, é bastante diversificada e inclui outros ambientes associados. Somente de Caatinga são reconhecidas 12 tipologias diferentes, as quais despertam atenção especial pelos exemplos fascinantes de adaptação aos ambientes semiáridos. Isso implica dizer que a relação entre os fatores abióticos como solo-clima-pluviosidade pode explicar, em parte, a grande diversidade de fisionomias aliadas à composição florística, com muitas espécies vegetais endêmicas no bioma (MELO; ANDRADE, 2007). A diversidade biológica da vegetação nativa da região semiárida do nordeste brasileiro é ainda pouco estudada do ponto de vista de seu potencial farmacológico.

Aliado ao fato de que essa vegetação foi reduzida em cerca de 50% de sua extensão original (CAMPELLO et al., 1999), é essencial a condução de estudos com o intuito de explorar a vegetação presente na Caatinga remanescente de forma sustentável e para manter a qualidade de vida da população do semiárido nordestino (LUCENA et al., 2007).

Nesse contexto de diversidade vegetal riquíssima, destacamos a espécie *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith. *A. pulchra*, da família Bignoniaceae, é uma liana que apresenta cálice membranáceo com tricomas multicelulares com ápice glandular avermelhado, distribuídos por toda a inflorescência, que confere a essa espécie uma tonalidade acastanhada característica (SILVA; QUEIROZ, 2003). No Brasil, plantas dessa família são encontradas desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único. Existem poucos relatos de estudos químicos do gênero *Arrabidaea*, sendo *Arrabidaea chica* a principal espécie estudada. De *Arrabidaea chica*, foram isolados: flavonoides, antocianinas, taninos, fitosteróis e pigmentos utilizados em cosméticos, tais como carajurona, carajurina e 3-deoxiantocianidina (TAKEMURA et al., 1995), e já foram demonstradas atividades tripanosomicidas e antifúngicas (BARBOSA et al., 2008). *A. chica* tem sido extensamente utilizada popularmente como planta medicinal por seus efeitos anti-inflamatórios em processos como inflamações uterinas, ovarianas e intestinais, bem como cólicas intestinais, conjuntivite, anemias e diabetes, cicatrização de feridas (DUKE; VASQUEZ, 1994; MORS et al., 2000).

Em relação aos estudos químicos de *A. Pulchra*, foi isolado ácido ursólico, a partir de folhas e caules, com atividade tripanosomicida (LEITE et al., 2001). Ácido ursólico é um triterpeno presente em muitas plantas medicinais, tem despertado intenso interesse em pesquisas nas áreas de farmacologia e toxicologia e é conhecido pelos seus efeitos

hepatoprotetores na fibrose e na cirrose hepática quimicamente induzida (LIU, 2005). Esses efeitos têm sido atribuídos a sua propriedade antioxidante, anti-inflamatória e sobre as enzimas hepáticas responsáveis pela metabolização de drogas.

Os produtos isolados de plantas formam uma grande gama de compostos naturais, sejam produtos de metabólitos primários ou secundários, podendo exercer efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. As reações adversas que os compostos das plantas podem desencadear são derivadas, em sua maioria, de seus componentes, por contaminantes ou pela forma de administração e preparo (ALMEIDA et al., 2009).

As pesquisas sobre a toxicidade ainda são escassas e, para o melhor entendimento do uso de produtos derivados de plantas como potencial farmacológico, é necessária a avaliação da relação risco-benefício do seu uso, por meio de estudos que verificam a sua farmacodinâmica e a toxicologia. Dessa forma, deve-se submetê-los a testes de eficácia e segurança por métodos recomendados pela legislação, obtendo-se as informações toxicológicas pré-clínicas obtidas com pesquisas em animais de laboratório previamente padronizadas (ALMEIDA et al., 200).

Este trabalho objetivou avaliar a existência de efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith em modelo experimental *in vivo* utilizando ratos *Wistar*, visando ao estabelecimento da segurança do seu uso para aplicações na formulação de terapêuticos hepatoprotetores.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith foram coletadas na Floresta Nacional de Açu do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – Estado do Rio Grande do Norte, Brasil – no ano de 2012, sob autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO, PROCESSO 29755), sendo a espécie identificada pelo referido instituto.

### **2.1.1 Preparação do extrato vegetal**

As folhas da planta foram secas em local sombreado com circulação de ar a temperatura de 24-35° C por 15 dias, trituradas e decantadas em uma solução de álcool absoluto por 24 horas e filtradas, repetindo-se o processo por três vezes. Em seguida, toda a solução foi filtrada e evaporada em evaporador rotativo (QUIMIS) a 55° C.

## **2.2 ANIMAIS**

Foram utilizados ratos Wistar machos com 45 dias de idade, pesando aproximadamente 100g, provenientes do Biotério do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob autorização da comissão de ética no uso de animais da mesma instituição (2A1113-38). Os animais foram distribuídos randomicamente em quatro grupos (grupo-controle, o grupo G1, o grupo G2 e o grupo G3) e acondicionados em caixas (cinco animais por caixa) de policarbonato forradas com maravalha. Os animais permaneceram no referido biotério em sala com ciclo de luz de 12 horas, aeração, exaustão e climatização controladas, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*.

### **2.2.1 Modelo do efeito toxicológico *in vivo***

Para o estudo de toxicidade de extrato hidroalcoólico das folhas de *A. pulchra*, o grupo-controle (CTRL) recebeu por via oral, utilizando-se seringa e sonda, água destilada no mesmo volume utilizado nos demais grupos; grupo G1 recebeu extrato na dose de 0,1g/Kg peso vivo, por via oral; o grupo G2 recebeu extrato na dose de 1g/Kg peso vivo; o grupo G3, extrato na dose de 2,5g/Kg peso vivo. Todos os animais pertencentes aos grupos G1, G2 e G3 foram submetidos à administração do extrato em diferentes concentrações, durante 60 dias, utilizando-se seringa e sonda para a sua administração. Ao término desse período, todos os animais foram eutanasiados por exsanguinação, sob anestesia com xilazina e cetamina. Após atingirem o plano anestésico ideal, foi coletado sangue em tubos sem anticoagulante. Após a centrifugação, os soros foram transferidos para microtubos e armazenados a -20° C até o momento da análise da bioquímica sérica.

## 2.2.2 Análise bioquímica sérica e histopatológica

A análise bioquímica sérica foi realizada com o seguinte painel: enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST), fosfatase alcalina, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, globulinas, colesterol e glicose. As análises foram realizadas em Analisador Bioquímico Automático (Celm) no laboratório de Patologia Clínica, na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), utilizando-se *kits* comerciais específicos (Katal). Imediatamente após o sacrifício, sangue, fígado e rim foram colhidos. Fragmentos representativos de fígado foram fixados em formol por 24 horas, e posteriormente, mantidos em álcool etílico 95% até a inclusão em parafina por meio de metodologia de rotina. Cortes de 5 µm de espessura, foram colhidos em lâminas sinalizadas e corados em Hematoxilina e Eosina, sendo observados ao microscópio ótico de campo claro para análise histopatológica. Fotomicrografias foram obtidas de microscópio Leica acoplado a um sistema de análise de imagem.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média±desvio-padrão. A análise estatística ANOVA de uma via foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prisma 5.0 *Software*. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes.

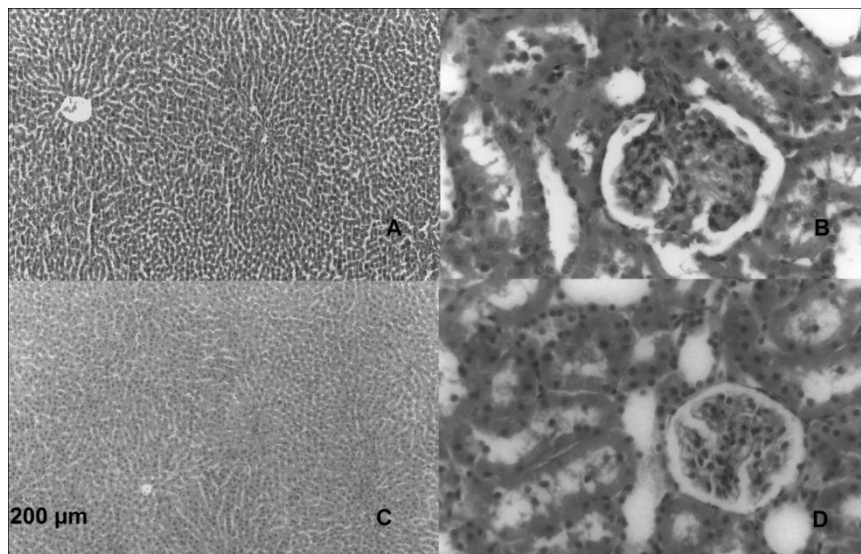
## 3 RESULTADOS E ANÁLISE

### 3.1 EFEITO TOXICOLÓGICO *IN VIVO*

Não foram identificadas alterações dignas de nota nos animais tratados em comparação ao controle nas análises histopatológicas realizadas nos rins e no fígado. Nos grupos-controle e no G1, os cortes histológicos de rim (Fig. 1 – B, D), glomérulos renais e ductos estavam preservados em todos os animais analisados. Do mesmo modo, os cortes de fígado (Fig. 1 – A, C), hepatócitos, espaços porta e veia hepática terminal estavam preservados e sem nenhuma alteração.

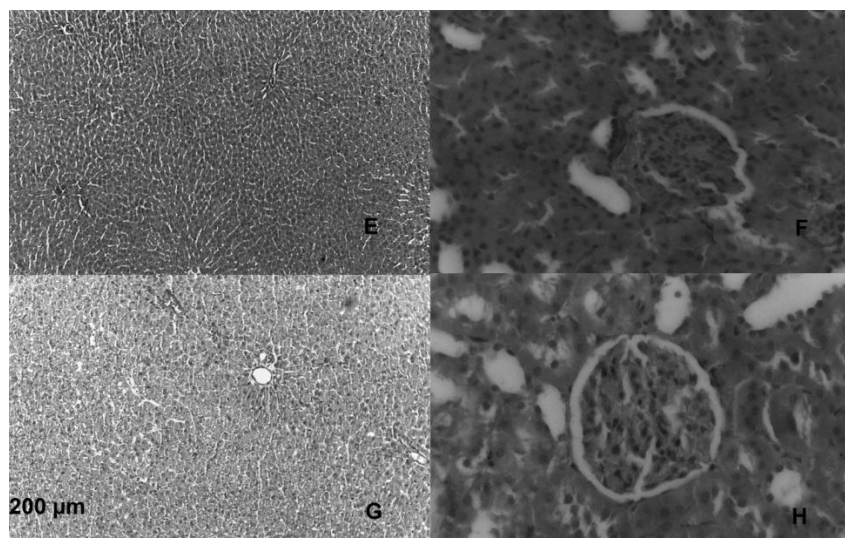
Os grupos tratados com as doses 1 g/Kg (G2) e 2,5 g/Kg (G3) do extrato hidroalcoólico também não apresentaram alterações histopatológicas nos rins nem no fígado

comparados ao grupo-controle, sendo mostrada, nos cortes histológicos de rim (Fig. 2 – F, H), a ausência de alterações nos glomérulos e nos ductos, estando esses totalmente preservados em todos os animais pertencentes aos grupos, como também os cortes histológicos do fígado (Fig. 2 – E, G) dos animais pertencentes aos grupos G2 e G1, mostrando ausência de modificações dignas de nota e preservação dos hepatócitos, espaços porta e veia hepática terminal.



**Figura 1 - Fotomicrografia dos tecidos hepáticos e renais dos grupos-controle (A, B) e o grupo G1 (C, D). Os hepatócitos, veia hepática terminal e espaço porta sem nenhuma alteração (A, C), como também os glomérulos renais e os ductos preservados (B, D).**

**Fonte: dados dos autores**



**Figura 2 - Fotomicrografia dos tecidos hepáticos e renais dos grupos G2 (E, F) e do grupo G3 (G, H), mostrando os hepatócitos, veia hepática terminal e espaço porta sem nenhuma alteração (E, G), assim como os glomérulos renais e os ductos preservados (F, H).**

**Fonte: dados dos Autores**

### 3.2 ANÁLISE BIOQUÍMICA SÉRICA

A análise bioquímica sérica (Tab. 1) não demonstrou diferenças entre os grupos tratados. Os níveis de ureia, creatinina, proteínas totais e glicose permaneceram estáveis, comparados ao grupo-controle. Os resultados obtidos dos níveis das enzimas ALT e AST não sofreram alterações comparadas ao grupo-controle, indicando que a administração do extrato hidroalcoólico de *A. pulchra*, nas doses testadas, não causou toxicidade hepática ou renal.

**Tabela 1- Efeito do extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea pulchra* nas doses 0,1 g/Kg, 1 g/Kg e 2,5 g/Kg por via oral sobre parâmetros bioquímicos em ratos Wistar (média ± desvio-padrão)**

Parâmetros Bioquímicos	Parâmetros Bioquímicos Normais	Grupo-Controle n=5	Grupo G1 n=5	Grupo G2 n=5	Grupo G3 n=5
AST <sup>1</sup>	85-110	108 ± 28	97 ± 25	85±10	133±110
ALT <sup>2</sup>	30-65	30 ± 25	49 ± 18	48±8	64±75
Ureia	50-80	62 ± 3	50 ± 6	73±18	51±11
Creatinina	0,4-1,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,6±0,1	0.4±0,1
Proteínas totais	5,1-6,8	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,5	5,1±0,2	6,5±5
Glicose	198-215	199 ±28	212,8 ± 9,6	208±±13	213±13

<sup>1</sup> Alanina aminotransferase; <sup>2</sup> Aspartato transaminase.

Fonte: Dados dos Autores

Há transaminases em pequenas concentrações no sangue, as quais são liberadas pelos hepatócitos, quando esses sofrem algum tipo de injúria. As alterações nos níveis de AST, quando existentes, também podem sugerir alterações em outros órgãos, como pulmão, rins e coração. As mudanças nos níveis de ALT sugerem alterações somente no fígado, por ser essencialmente hepático. Já a função renal é baseada nas alterações dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina (BARROS et al., 2010; SEFFRIN et al., 2008). Nas nossas condições experimentais, não observamos nenhuma alteração significativa do painel bioquímico analisado.

As plantas tóxicas podem ser definidas como todo vegetal que, em contato com o organismo humano ou de animais e em condições naturais, são capazes de causar algum dano na saúde desses seres. Há algumas espécies do gênero *Arrabidaea* que já demonstraram efeito tóxico, acarretando a morte súbita de animais, é o caso das espécies *Arrabidaea bilabiata*, *Arrabidaea japurensis* (HARAGUCHI, 2003; TOKARNIA et al., 2004). Por outro lado,

Ribeiro et al. (2011) relataram a ausência de toxicidade da espécie *Arrabidaea chica* em um modelo murino e possível efeito antitumoral.

Nessa perspectiva, estudos sobre a avaliação de toxicidade de plantas são necessários para elucidar os efeitos ocasionados por elas, com o intuito de promover uma ampliação de dados na literatura para discussão de resultados, como também para assegurar o uso dos produtos pela população e por animais (ALMEIDA et al., 2009).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tomando como base nossos resultados, podemos concluir que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith, nas doses de 0,1g/Kg, 1g/Kg e 2,5g/Kg, apresenta ausência de toxicidade. O estudo histopatológico dos órgãos analisados, rim e fígado, não apresentou nenhuma alteração arquitetônica. De maneira geral, a sua administração via oral não produziu alterações indesejáveis sobre os parâmetros bioquímicos testados, não resultando em toxicidade para ratos Wistar. Esse fato corrobora os dados histológicos e demonstra ausência de toxicidade renal e hepática, bem como relativa segurança na administração de extratos de *A. pulchra* nas condições experimentais estudadas. Assim sendo, o estudo do potencial farmacológico dessa planta pode ser avaliado pelo uso de outros experimentos, em modelos *in vitro* ou *in vivo*, para pesquisarmos as potencialidades terapêuticas e citotóxicas da *Arrabidaea pulchra* (Cham.) Sandwith. Estudos adicionais também devem ser realizados com extratos fracionados e eventualmente compostos isolados.

#### REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. C. et al. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. **Ciência Rural**. Santa Maria: Online, 2009.

BARBOSA, W. L. R. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.

BARROS, J. D. et al. Acute Pre-Clinical Toxicologica Study and Determination of LC50 of Crude Dry Vitex Agnus Castus Linn Leaves. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Vol 7 (3), p.62 – 71, 2010.

CAMPELLO, F. B. et al. Diagnóstico florestal da região nordeste. **Projeto IBAMA**, Natal, PNUD/BRA/93/033, (Boletim técnico, n.2), p.16, 1999.

DUKE, J.; VASQUEZ, R. **Amazonia ethnobotanical dictionary**. Boca Raton: CRC Pressa, p.215, 1994.

HARAGUCHI, M. Plantas tóxicas de interesse na pecuária. **Biológico**. São Paulo, v. 65, n. 1/2, jan./dez., p. 37-39, 2003.

LEITE, J. P. V. et al. Isolamento biomonitorado de uma substância tripanossomicida de *Arrabidaea triplinervia* (Bignoniaceae), o ácido ursólico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 77-87, 2001.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92-94, 2005.

LUCENA, R. F. P.L. et al. Useful plants of the semi-arid northeastern region of Brazil – a look at their conservation and sustainable use. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 125, p. 281-290, 2007.

MELO, J. I. M.; ANDRADE, W. M. Boraginaceae *s.l.* A. Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 21, n. 2, p. 369-378, 2007.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**, FILIPPS, R. A (Ed.), Medicinal plants of the world 6. Reference Publication, Algonac, 501 pp, 2000.

RIBEIRO, A. F. C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, Curitiba, mar./abr. 2012 e pub Dec. 05, 2011.

SEFFRIN, R. C. A. S. et al. Extratos aquosos de frutos verdes de *Melia azedarach L. var. azedarach*. **Revista Biotemas**, 21 (3), setembro, p.143-147, 2008.

SILVA, M. M.; QUEIROZ, L. P. A família Bignoniaceae na região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 3, n. ½, p. 3-21, 2003.

TOKARNIA, C. H. et al. Aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, abr./jun, 24(2), p. 74-79, 2004.

TAKEMURA, O. S. et al. A flavone from leaves of *Arrabidaea Chica* f. Cuprea. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1299-1300, 1995.