

Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal

Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route

Anna Christina Almeida^{1*} Eliane Macedo Sobrinho^{II} Lucineia de Pinho^I Patrícia Nery Silva Souza^I
Ernane Ronie Martins^I Eduardo Robson Duarte^I Hércules Otacílio Santos^{III} Igor Viana Brandi^{II}
Alex Sander Cangussu^{II} João Paulo Ramos Costa^I

RESUMO

O estudo objetivou realizar ensaio toxicológico pré-clínico inicial para investigar a toxicidade das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) e barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] e do farelo da casca de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), por meio da determinação da dose letal 50% (DL_{50}). Na investigação da DL_{50} foram utilizados grupos de camundongos Swiss de mesmo sexo ($n=150$, sendo 30 animais por tratamento) inoculados, por via intraperitoneal, com diluições seriadas do extrato hidroalcoólico das folhas de alecrim, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi. Após a inoculação, os animais foram observados por um período de 14 dias, para determinar a quantidade de mortos, doentes e sobreviventes. O estudo toxicológico pré-clínico agudo demonstrou, em camundongos por via intraperitoneal, toxicidade igual a $0,31\text{mg mL}^{-1} DL_{50} \text{ mL}^{-1}$ para todas as plantas, exceto para o barbatimão, que apresentou toxicidade igual a $0,25\text{mg mL}^{-1}$. Pesquisas devem ser realizadas visando a obter dados de toxicidade das plantas em outras vias para assegurar o uso em saúde humana e animal.

Palavras-chave: intoxicação, plantas medicinais, camundongos, intraperitoneal, *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens*, *Caryocar brasiliense*.

ABSTRACT

This study aimed to conduct pre-clinical toxicology testing to investigate the toxicity of *Lippia sidoides* Cham.,

Myracrodruon urundeuva Fr. All., *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville and *Caryocar brasiliense* Camb., by determining the 50% (LDL_{50}) lethal dose. In the investigation of the LD_{50} groups of Swiss mice of the same sex were used ($n=150$; 30 animals per plant and all inoculated intraperitoneally with serial dilutions of the aqueous fraction obtained from the leaves of plants. After inoculation, the animals were observed along a period of 14 days in order to observe the dead, sick and survivors rate. In mice inoculated intraperitoneally, the acute pre-clinical toxicology testing demonstrated toxicity equal to $0,31\text{mg mL}^{-1} LD_{50} \text{ mL}^{-1}$ for all plants. The exception was for *Stryphnodendron adstringens*, which presented toxicity equal to a $0,25\text{mg mL}^{-1} DL_{50} \text{ mL}^{-1}$ and values expressed in terms of dilution. Research should be conducted to obtain data on toxicity of the plants in other ways to ensure the use in human and animal health. Therefore, the studied plants should be used with caution. They present a relatively mild toxic potential, but it may be harmful to users if they are not properly utilized.

Key words: toxicity, *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens*, *Caryocar brasiliense*.

Os produtos isolados de plantas compõem uma vasta gama de compostos orgânicos naturais, produtos do metabolismo primário e secundário, que podem exercer efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. As reações adversas que as plantas poderão desencadear podem ser decorrentes de seus próprios

^IInstituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Avenida Universitária, n. 1000, Bairro Universitário, 39404-006, Montes Claros, MG, Brasil. E-mail: aca2006@nca.ufmg.br. *Autor para correspondência.

^{II}VALLÉE S.A. Montes Claros, MG, Brasil.

^{III}Instituto Butantan, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

componentes, pela presença de contaminantes ou, até mesmo, pelas preparações caseiras duvidosas (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Para assegurar o uso desses produtos, deve-se submetê-los a testes de eficácia e segurança por métodos recomendados pela legislação, sendo as informações toxicológicas pré-clínicas obtidas com pesquisas em animais de laboratório previamente padronizadas (BRASIL, 2004). Apesar do uso disseminado de plantas medicinais, as pesquisas que avaliam a toxicidade desses produtos são escassas (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Para melhor entendimento do uso de plantas, é necessária a avaliação da relação risco/benefício do seu uso, por meio de estudos farmacodinâmicos e toxicológicos. Portanto, o uso pela medicina popular baseado no conhecimento tradicional não são suficientes para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (FARIAS et al., 2007).

O Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos publicou, em janeiro de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Nessa lista, constam as plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. Dentre algumas espécies, constam o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) e barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. (BRASIL, 2009).

Considerando que o uso de plantas é prática prevalente em ampla faixa populacional brasileira, incluindo as populações de áreas rurais localizadas no cerrado, uma série de outras plantas poderão vir a ser incluídas no RENISUS a partir do relato do uso frequente na medicina popular. Assim, é evidente a necessidade de pesquisas que avaliem as potencialidades farmacológicas, assim como a toxicidade dessas plantas para que possam ser indicadas para uso na rede pública de saúde.

A literatura apresenta poucos dados sobre a toxicidade do alecrim-pimenta (FARIAS et al., 2007) e do barbatimão (REBECCA et al., 2002; AUDI et al., 1999; LIMA et al., 1998), já sobre a aroeira e o pequi não foram encontrados relatos na literatura.

Este trabalho objetivou relatar os resultados obtidos com a investigação preliminar da toxicidade pré-clínica dos extratos das folhas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e do farelo da casca de pequi (*Caryocar brasiliense*), por meio da determinação da dose letal 50% (DL₅₀), utilizando a via intraperitoneal, visando à disponibilização de dados que poderão ser utilizados em pesquisas futuras.

As plantas foram coletadas no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) de acordo com sua distribuição natural e disponibilidade local. O material foi identificado segundo os padrões da taxonomia clássica, utilizando bibliografia adequada, comparação com exsiccatas existentes em herbários da UFMG e consulta a especialistas.

Na preparação do extrato, as plantas foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, com temperatura de 40°C, até peso constante. Após esse procedimento, foram trituradas e pesadas. Na obtenção dos extratos, os fragmentos vegetais foram acondicionados em Becker, sendo então totalmente submersos em etanol 50%. Os conjuntos formados foram incubados em banho-maria a 60°C, por 60 minutos. Após esse tempo, foi realizada filtração a quente, em funil com algodão. Os extratos obtidos foram levados à estufa 40°C, para secagem, até peso constante (KRYCHAK-FURTADO, 2006).

Para determinação da DL₅₀, os extratos foram ressuspensos em etanol 70%, obtendo-se a concentração de 200mg ml⁻¹. Foram utilizados 120 camundongos *swiss* de mesmo sexo, com 17-22g, sendo 30 animais para cada extrato vegetal, já que para cada extrato foram inoculadas cinco diluições, com seis camundongos cada, conforme recomendações de BRASIL (2004). Cada um dos extratos foi submetido a diluições seriadas utilizando-se o fator de diluição 1:10. As diluições da amostra foram realizadas em solução salina peptonada. As amostras foram mantidas sob refrigeração, até a aplicação em camundongos. Em seguida, 0,5mL de cada uma das diluições foram inoculados, intraperitonealmente, em seis camundongos *swiss* de mesmo sexo, com peso entre 17 e 22g. As amostras foram diluídas até a diluição 1:10000. Os camundongos foram observados por um período de 14 dias, e as mortes registradas em protocolos específicos. Após esse período, a DL_{50%} foi calculada com o método REED & MUENCH (1938). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal da UFMG.

Com exceção de extrato do barbatimão, todos os outros provocaram morte nos camundongos inoculados com a diluição 10⁻¹. Os valores de DL₅₀ mostraram que o extrato obtido da folha de barbatimão é o mais tóxico, com uma dose letal 50% igual a 0,25mg mL⁻¹. Para os demais extratos, a dose letal foi igual a 0,31mg mL⁻¹. O valor mais baixo de DL₅₀ para o barbatimão revela a sua elevada toxicidade em relação aos demais extratos. Os valores de toxicidade aguda para os extratos de folhas de alecrim, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi foram

semelhantes nas mesmas concentrações. De acordo com REPETTO (1997), os extratos podem ser considerados de alta toxicidade, pois a DL50% foi superior ou igual a 25mg kg⁻¹.

A literatura de referência na área não apresentou nenhum estudo farmacológico dessa natureza desenvolvido anteriormente para a aroeira e o farelo da casca de pequi (ESCOP, 2003; WHO, 1999; WHO, 2004; WHO, 2007). Para o alecrim-pimenta e barbatimão, os estudos são escassos.

FARIAS et al. (2007) avaliaram a toxicidade de extratos metanólicos de *Lippia sidoides* pela via via intraperitoneal e concluíram que a DL50 do extrato bruto de folhas determinada foi de 1329,17mg kg⁻¹. Destaca-se que os autores também não encontraram na literatura estudos farmacológicos dessa natureza para discussão dos resultados.

A toxicidade aguda de extratos de barbatimão por via oral foi avaliada por REBECCA et al. (2002), AUDI et al. (1999) e LIMA et al. (1998). A DL50% encontrada pelos diferentes autores foi de 400mg kg⁻¹, 800mg kg⁻¹ e 2699mg kg⁻¹, respectivamente. Dados referentes a estudos de toxicidade pré-clínica utilizando a via intraperitoneal para essa planta não foram encontrados na literatura, sendo esse um dado novo que poderá fornecer subsídio para pesquisas futuras, tendo em vista o interesse do Ministério da Saúde pela planta (BRASIL, 2009).

Outros pesquisadores também utilizaram a via intraperitoneal para estudos com outras plantas e obtiveram resultados disponíveis em literaturas de impacto na área de plantas medicinais, sendo eles BAFOR & IGBINUWEN (2009), NOORSHAHIDA et al. (2009) e OBICI et al. (2008).

Os dados encontrados na literatura são superiores aos obtidos no trabalho aqui apresentado; porém, deve-se considerar que houve diferenças metodológicas na forma de obtenção dos extratos, nas vias de inoculação, nas partes dos vegetais utilizados, bem como na análise dos resultados. Outra variável que poderá estar envolvida com as diferenças observadas seria a variação fisiológica entre plantas cultivadas e colhidas em diferentes condições ambientais, porém são dados importantes para pesquisas futuras com essas duas plantas.

Os animais inoculados com todos os extratos avaliados neste trabalho apresentaram reações caracterizadas como neurovegetativas, com respostas estimulantes e depressoras (BRASIL, 2004). Os sinais clínicos apresentados pelos animais, para as doses pura, diluída 1:10 e diluída 1:100, em maior ou menor grau, incluíram respostas estimulantes nos primeiros 5 minutos após aplicação. Tais sinais incluíram reações

estimulantes iniciais para todas as doses testadas, em menor ou maior grau, como agitação, reação de fuga, movimentos estereotipados, circulares e de vibrissas, piloereção, tremores finos e grosseiros, alteração da marcha, aumento da frequência respiratória, espasmos etc. Após os cinco minutos da administração dos extratos, os efeitos observados passaram de estimulantes para depressores, caracterizados por abaixamento de trem posterior, dispneia, sedação, palidez, prostração, cianose e/ou morte.

Apenas na diluição 1:100 foi verificada a total recuperação dos animais após 48 horas de observação, com exceção para o extrato de folha de barbatimão, em que, mesmo nessa diluição, um animal foi a óbito em menos de 48 horas.

Situação semelhante ocorreu em outros estudos, com outros extratos de planta, como foi o caso do extrato metanólico de folhas de alecrim-pimenta por via intraperitoneal (FARIAS et al., 2007) e de extrato aquoso da casca do barbatimão (REBECCA et al., 2001), porém com utilização da via oral. Outros trabalhos sobre a avaliação de características neurovegetativas com exposição aos extratos das plantas em estudo não são descritos na literatura (ESCOP, 2003; WHO, 1999; WHO, 2004; WHO, 2007).

Em estudo extenso feito por TUROLLA & NASCIMENTO (2006) em busca de informações toxicológicas de alguns fitoterápicos de uso constante no Brasil, entre as 10 plantas pesquisadas em seis bases de dados, foram encontrados resultados de DL50% de apenas cinco plantas, com a utilização de metodologias variadas e obtenção de resultados variados.

A dificuldade de encontrar dados na literatura para discussão de resultados de avaliação de toxicidade reforça a necessidade de estudos dessa natureza que trarão grande contribuição para utilização segura desses produtos pela população humana e animal.

O estudo toxicológico pré-clínico agudo de extratos hidroalcoólicos de folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi demonstrou que os produtos avaliados possuem toxicidade aguda na via intraperitoneal, sendo uma contribuição para pesquisas em plantas que compõem a RENISUS, o alecrim-pimenta e o barbatimão, assim como outras com potenciais farmacológicos, como o pequi e a aroeira.

Porém, ressalta-se a necessidade de sejam realizadas outras pesquisas que possibilitem comparar os resultados em outras vias e sejam feitas as análises anatomopatológicas dos animais, para assegurar que o uso dessas plantas na saúde humana e animal.

COMITÊ DE ÉTICA E BISEGURANÇA

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (processo nº 34/08), e os estudos foram realizados de acordo com as normas do Código de Ética Profissional do Médico Veterinário e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

REFERÊNCIAS

- AUDI, E.A. et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v.13, p.264-266, 1999. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/61501314/PDFSTART>>. Acesso em: 30 set. 2009. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199905)13:3<264::AID-PTR443>3.0.CO;2-R.
- BAFOR, E.E.; IGBINUWEN, O. Acute toxicity of the leaf extract of *Ficus exasperate* on hematological parameters, body weight and body temperature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.302-307, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T8D-4VVR1VS-2-5&_cdi=5084&_user=686413&_orig=browse&_coverDate=06%2F22%2F2009&_sk=998769997&view=c&wchp=dGLbVlW-zSkWA&md5=c791a7cd15ed2b08429fd66770f8942a&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 30 set. 2009. doi:10.1016/j.jep.2009.03.001.
- BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE no. 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo. Brasília, DF. 12 de março de 2004.
- EUROPEAN SCIENTIFIC COOPERATIVE ON PHYTOTHERAPY. **Escop monographs**. 2.ed. Exeter: ESCOP, 2003. Disponível em: <<http://www.escop.com/>>. Acesso em: 02 ago. 2008.
- FARIAS, E.M.F.G. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato metanólico de folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) In. CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 2007, Natal, RN. **Anais...** Natal: Sociedade Brasileira de Química. 2007. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/7/7-600-750.htm>>. Acesso em: 01 ago. 2008.
- KRYCHAK-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do paraná: testes in vitro e in vivo**. 2006. 147f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Departamento de fitotecnia e fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- LIMA, J.C.S. et al R. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v.12, p.218-220, 1998. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/10006174/PDFSTART>>. Acesso em: 30 set. 2009. doi: 10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<218::AID-PTR220>3.0.CO;2-4.
- NOORSHAHIDA, A. et al. Hypoglycemic effect of quassinoids from *Brucea Javanica* (L.) Merr (Simaroubaceae) seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, n.3-30, p.586-591, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T8D-4W7YXT9-1-K&_cdi=5084&_user=686413&_orig=search&_coverDate=07%2F30%2F2009&_sk=998759996&view=c&wchp=dGLzVtb-zSkWA&md5=1dbd2656c1b6ffb3fd752a88f63021d&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 30 set. 2009. doi: 10.1016/j.jep.2009.04.058 . 2009.
- OBICI, S. et al. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.131-139, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T8D-4PRRBMH-1-1&_cdi=5084&_user=686413&_orig=search&_coverDate=01%2F04%2F2008&_sk=998849998&view=c&wchp=dGLbVlW-zSkzV&md5=5e9a9d3a01e7ceaa5fd2ae323b1a5663&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 30 set. 2009. doi:10.1016/j.jep.2007.09.013.
- REBECCA, M.A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, n.1-2, p.101-104, 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6T8D-472KXMV-G-3&_cdi=5084&_user=686413&_orig=browse&_coverDate=11%2F30%2F2002&_sk=999169998&view=c&wchp=dGLbVlW-zSkzS&md5=2c4f7dc0600ec5d4484c3f8b7082d548&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: 30 set. 2009. doi:10.1016/S0378-8741(02)00219-2.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.493-497, 1938.
- REPETTO, M. Toxicologia experimental. In:REPETTO, M. **Toxicologia fundamental**. 3.ed Madrid: Diaz de Santos,1997. p.291-300.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.289-306, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfc/v42n2/a15v42n2.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2009. doi: 10.1590/S1516-93322006000200015 .
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who monographs on selected medicinal plants**. 1999. v.1. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/1999/9241545178.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. 2004. v.2. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2002/9241545372.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. 2007. v.3 Disponível em: <<http://www.who.int/medicinedocs/index/assoc/s14213e/s14213e.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2008.