

Avaliação da toxicidade não-clínica aguda de *Waltheria viscosíssima* A. S. Hil. – Malvaceae em ratos

Evaluation of non-clinical acute toxicity of *Waltheria viscosíssima* A. St. Hill – Malvaceae in rats

DOI: 10.34119/bjhrv5n3-069

Recebimento dos originais: 14/02/2022

Aceitação para publicação: 28/03/2022

Luiza Toscano Dias Rodrigues

Residência Médica em Oftalmologia pela UNESP, Graduação em Medicina pela UFPB

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Rua Silvio Almeida, 646, Expedicionarios, João Pessoa/PB – Brasil

CEP: 58041-020

E-mail: luizatoscano@hotmail.com

Lucas Rannier Ribeiro Antonino Carvalho

Pós-doutorado em Fisiologia e Farmacologia

Instituição: Karolinska Institutet

Endereço: Olof af Acrels vag 7 – Solna Suécia, Zip code 17164

E-mail: lucas.carvalho@ki.se

Ricardo Barbosa de Lucena

Pós-doutorado pelo LPV-UFSM

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Centro de Ciências Agrárias - Campus II CEP: 58.397-000 - Areia - PB - Rodovia BR 079 - km 12 - Brasil

E-mail: lucena.rb@gmail.com

Thyfanne Suellen Tavares Linhares

Bacharel em Farmácia

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Rua Chico Xavier, 289 – Bairro das Indústrias – João Pessoa/PB - Brasil

E-mail: thyfanelinharesfarmaceutica@gmail.com

Micheline Freire Donato

Doutora em Fisiologia - ICB/UFGM; Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacologia. DCF/UFPB.

Instituição: Professora Visitante do Programa de Pósgraduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, DCF/CCS. Laboratório de Ensaios Toxicológicos - LABETOX.

Universidade Federal da Paraíba.

Endereço: Recanto da Milona. Via Ipê Amarelo. Lot. Cidade Universitaria, PB. Campus I. João Pessoa/PB - Brasil.

E-mail: micheline.donato@gmail.com

Maria de Fátima Vanderlei de SouzaDoutorado em Química Orgânica pela USP
Instituição: Universidade Federal da ParaíbaEndereço: Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Campus I,
Cidade Universitária, João Pessoa/PB.
E-mail: mfvanderlei@ltf.ufpb.br**Maria Denise Leite Ferreira**Doutora em produtos naturais sintéticos e bioativos
Instituição: UNIESP e Faculdades Nova EsperançaEndereço: rua Pedro Juscelino de Aquino, 379, Bancários, João Pessoa-PB.
E-mail: deninsecaiana@yahoo.com.br**Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**

Doutorado

Instituição: Universidade Federal da Paraíba

Endereço: Avenida Mar Cáspio, 109, Casa 58102162, Intermares, Cabedelo-PB.
E-mail: margarethdiniz.ufpb@gmail.com**RESUMO**

Objetivo: Avaliação toxicológica não clínica aguda do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Waltheria viscosissima* A.St. Hil.(EEBW_v), com base no “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica” necessária ao desenvolvimento de medicamentos” e na OECD 423. Métodos: Ensaio toxicológico delineado seguindo a OECD 423. Ratas Wistar (n=6) foram administradas por via oral com uma dose única de 2000 mg/kg do EEBW_v e observadas por 14 dias, com avaliação do consumo de água e ração, evolução ponderal, marcadores bioquímicos e hematológicos, alterações macroscópicas dos órgãos e exame anatomopatológico. Para comparação, foi utilizado um grupo controle (não-tratado) com ratas Wistar (n=6) administradas com o veículo (DMSO a 10%). Resultados: O EEBW não apresentou alterações toxicológicas relevantes, apresentando diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo tratado com EEBW_v respectivamente, apenas com os valores de proteína total (PT) (6,04±0,21 para 6,72±0,23) e Globulina (2,47±0,83 para 3.62±0,31 (p < 0,05). Não foram evidenciadas alterações macroscópicas/microscópicas nos órgãos vitais após os 14 dias da administração. Conclusão: O EEBW_v se enquadra na categoria de Classe 5 (substância com DL₅₀ superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerado seguro e de baixa toxicidade.

Palavras-chave: toxicidade aguda, oecd 423, medicamentos fitoterápicos, toxicologia.

ABSTRACT

Objective: To perform acute non-clinical toxicological evaluation of crude ethanol extract from aerial parts of *Waltheria viscosissima* A.St. Hil., based on the “Guide for the conduct of non-clinical toxicology and pharmacological safety studies” necessary for drug development and on OECD 423. Methods: A single oral dose of 2000 mg/kg was used in six females Wistar rats. The water and food intake, weight, biochemical and hemathological parameters, macroscopic and histopathological findings were observed. A group of 6 animals (females) was also treated with the extract dilution vehicle (water and 10% DMSO), remaining as a control group. Results: The parameters that showed significant difference by Treated and Control groups were protein (PT) and Globulin (P-Value < 0.05), which were higher in the treated group compared to control. There were no macroscopic or microscopic changes in vital organs after 14 days of the

study. Conclusion: By the class method, the ethanol extract of aerial parts of *Waltheria viscosissima* A.St. Hil. falls into Class 5 (substance with LD50 greater than 2000 mg/kg and less than 5000 mg/kg), being considered of low toxicity.

Keywords: acute toxicity, oecd 423, phytotherapeutic drugs, toxicology.

1 INTRODUÇÃO

A bioprospecção de fármacos tem a natureza como fonte de medicamentos por milênios, sendo muitas drogas desenvolvidas a partir de produtos naturais vegetais. Os compostos vegetais são comumente utilizados pela população de forma tradicional, uma vez que possuem como constituintes os metabólitos secundários ativos com potencial terapêutico. Nesse contexto, a etnofarmacologia se tornou a base e o direcionamento para muitos estudos com plantas medicinais (SEIDEL V, 2020; THOMFORD NE, et al., 2018).

O Brasil possui uma diversidade de mais de 45 mil espécies de vegetais, correspondendo a cerca de 20–22% do total mundial, e gerando um imenso potencial para pesquisas e desenvolvimento de fármacos. Logo, o Ministério da Saúde apontou que a procura por plantas medicinais e fitoterápicos pela população vem crescendo de 10 a 15% ao ano. Porém, mesmo com esse aumento, a participação do país no mercado de medicamentos ainda é de apenas 2%, o que mostra a necessidade de investimentos econômicos na descoberta de fármacos e desenvolvimento de novos fitoterápicos (DUTRA RC, et al., 2016; RIBEIRO VP, et al., 2018; CARVALHO ACB, et al., 2017).

Das plantas nativas do Brasil já utilizadas pela medicina tradicional, destacam-se as da família Malvaceae, que possui 243 gêneros com 4225 espécies conhecidas, incluindo algumas economicamente importantes, como o algodão (*Gossypium* spp.) e o cacau (*Theobroma* spp.) (WANG D, et al., 2020). Dentre as espécies dessa família, a *Waltheria viscosissima* A.St. Hil., conhecida popularmente como “malva viscosa” ou “malva branca” é rica em mucilagem e óleo etéreo, sendo encontrada nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. No Nordeste, está presente nos estados do Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Sergipe, sendo também encontrada no Mato Grosso e Distrito Federal, na região Centro-Oeste e sudeste. É bastante utilizada pela medicina popular como expectorante, antitussígena e anti-hipertensiva. Apesar do uso popular consolidado, ainda são escassos estudos científicos sobre a espécie (ROLIM YM, 2015).

Dentre os componentes fitoquímicos foram identificados quatorze compostos do extrato etanólico bruto das partes aéreas da *Waltheria viscosissima* (EEBWv): um decanol (álcool), um derivado de clorofila, uma mistura de esteroides, sete flavonoides e três triterpenos. A análise

por métodos espectrofotométricos demonstrou que o extrato das partes aéreas possui alta concentração de flavonoides e o extrato das raízes é rico em outros compostos fenólicos. A fase acetato de etila do particionamento do EEBWv e as fases obtidas através de técnicas cromatográficas em coluna levaram ao isolamento de três substâncias: uma mistura de walthersona A e walthersona B e tilirosídeo (FERREIRA MDL, et al., 2019).

Tanto o extrato da raiz quanto o das partes aéreas demonstrou potencial antioxidante. O extrato das raízes da *W. viscosíssima* apresentou potente atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, demonstrando um potencial uso em preparações economicamente viáveis para controle doméstico de insetos vetores de doenças graves como dengue e Zika. (BOVINI MG, et al., 2001; ESTEVES GL, 2006; ROLIM YM, 2015; FERREIRA MDL, et al., 2019). Já o flavonoide tilirosídeo, encontrado em abundância no EEBWv assim como em outras plantas do gênero *Waltheria*, possui diversas potenciais atividades biológicas documentadas, como antioxidante, hepatoprotetora, antialérgica, antitrombótica, neuroprotetora, osteogênica, antiobesidade, antidiabética, antimicrobiana e antiinflamatória (SOUSA AP, ET AL., 2021; GROCHOWSKI DM, et al., 2018).

Apesar de todo potencial para pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, muitas das plantas medicinais da flora brasileira, incluindo-se a *Waltheria viscosissima* A.St. Hil, são consumidas com insuficiente ou nenhuma comprovação de suas propriedades terapêuticas e tóxicas, podendo assim acarretar num sério problema de saúde pública. É importante ressaltar que efeitos adversos, adulteração do produto, toxicidade e interações medicamentosas são possíveis de serem verificados tanto com medicamentos alopáticos convencionais quanto com os fitoterápicos. Comprovando este fato, pesquisas demonstraram que muitos deles possuem substâncias potencialmente tóxicas, e por esse motivo devem ser utilizados com cuidado, respeitando seus riscos à saúde (GASTON TE, et al., 2020).

Em prol de conhecer os possíveis efeitos adversos em relação aos tecidos, órgãos e sistemas biológicos, e quando aplicável sua reversibilidade potencial a partir de extratos brutos ou substâncias isoladas oriundas de produtos naturais, o processo de avaliação toxicológica não clínica *in vivo* é fundamental para o desenvolvimento de um novo medicamento, uma vez que diminui a probabilidade de substâncias com risco de segurança ingressarem no uso e desenvolvimento de pesquisas clínicas (TONHOLO DR, 2018). Dessa forma, o presente trabalho objetiva avaliar a toxicidade do extrato etanólico bruto das partes aéreas da *Waltheria viscosissima* A. St. Hil., após a sua administração aguda (dose única) via oral.

2 MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Waltheria viscosíssima* A.St.Hil.

Para a preparação do EEBWv, as partes aéreas da planta *Waltheria viscosissima* A. St. Hil. foram desidratadas em estufa, com ar circulante, à temperatura média de 40 °C durante 96 horas. Em seguida, foram trituradas em moinho mecânico, obtendo-se aproximadamente 5,5 kg de pó. Este foi macerado em etanol (EtOH) a 95% por 72 horas para a extração dos constituintes orgânicos. A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador a 40 °C, fornecendo aproximadamente 570 g do extrato etanólico bruto.

2.2 ENSAIO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO AGUDO (DOSE ÚNICA)

Estudo experimental realizado seguindo as recomendações do “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica” necessária ao desenvolvimento de medicamentos, conforme preconizado pela IN nº 4, de 18 de junho de 2014 (Brasil, 2013), assim como nos guias de orientação para ensaios de toxicidade da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2002).

Ratas Wistar (n=6 animais) foram divididas em gaiolas contendo 3 animais cada, receberam a dose de 2000 mg/Kg de peso corporal, por gavagem (via oral) do EEBWv. A dose utilizada seguiu o preconizado pela OECD 423, que é a um conjunto de especificações internacionalmente aceitas para o teste de produtos químicos, apresentado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico. De acordo com este guia, a dose inicial dos testes de toxicidade deve ser aquela mais provável de produzir mortalidade em alguns dos animais do experimento, sendo a dose limite a de 2000 mg/kg (OECD 423, 2002).

Após a administração do EEBWv ou veículo, os animais ficaram em observação nos intervalos de 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, nos 13 dias consecutivos, com o objetivo de investigar possíveis alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou no Sistema Nervoso Autônomo (SNA). Para comparação, foi utilizado um grupo controle (não-tratado) com ratas Wistar (n=6) administradas com o veículo (água e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Diariamente, foram monitorados o consumo de água, a ingestão de alimentos e o peso dos animais, este último para cálculo da evolução ponderal (ALMEIDA RN e OLIVEIRA TML, 2006).

Os parâmetros comportamentais observados foram: sinais tóxicos de caráter geral, efeitos sobre a locomoção, comportamento, respiração, análises hematológicas e bioquímicas

do sangue. As análises hematológicas incluíram o estudo da série vermelha: eritrograma com contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude de distribuição dos eritrócitos; e o estudo da série branca: leucograma com contagem global dos leucócitos e contagem da diferenciação celular, contagem de plaquetas, volume plaquetário médio, amplitude de distribuição volumétrica das plaquetas, plaquetócrito e contagem de plaquetas grandes. As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de soro com dosagens de glicose, ureia, creatinina, ácido úrico, magnésio, proteínas totais, albumina, colesterol total, triglicerídeos, gama glutil transferase (GGT), fosfatase alcalina (pelo método cinético) e transaminases: Aspartato Amino Transferase (AST) e Alanina Amino Transferase (ALT).

Ao fim do período de 14 dias, todos os animais sobreviventes foram eutanasiados por overdose com injeção intraperitoneal de cetamina (210 mg/Kg) e a xilazina (30 mg/Kg), segundo recomendação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. Em seguida, foi realizada a necropsia e os órgãos dos animais, tais como coração, estômago, baço, fígado e rins foram coletados e fixados em formol a 10% para a análise anatomopatológica. As amostras dos tecidos foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, defanizadas pelo xilol e incluídas em parafina líquida (a 60°C). Em seguida, cortes uniformes (5 µm de espessura) foram realizados utilizando micrótomo, com posterior coloração pela hematoxilina-eosina para posterior análise histopatológica em microscopia de luz.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada com a utilização do programa estatístico SPSS, versão 20.0 e software R. Foi realizada a estatística descritiva com as variáveis da pesquisa, utilizando o teste de hipótese t-Student paramétrico, quando a variável possuía distribuição normal, avaliado segundo o teste de Skapiro-Wilkst (P-valor < 0,05), e os testes não paramétricos de Wilkcoxon e Mann-Whitney para o caso de não normalidade, comparando os grupos tratado com EEBWv e Controle (não tratado). Na avaliação longitudinal do peso dos animais utilizou-se uma análise não paramétrica para o experimento F1 LD F1 da library nparLD do software R uma vez que a análise paramétrica para medidas repetidas não é aconselhável para tamanhos de amostras pequenas (n=12), e que nesta análise produziu resultados divergentes pelo método paramétrico.

2.4 CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE APRECIÇÃO ÉTICA

O número de animais utilizado e os procedimentos experimentais foi aprovado previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB), protocolado sob o CEUA nº 6087070319.

3 RESULTADOS

3.1 ESTUDO TOXICOLÓGICO NÃO CLÍNICO AGUDO (DOSE ÚNICA)

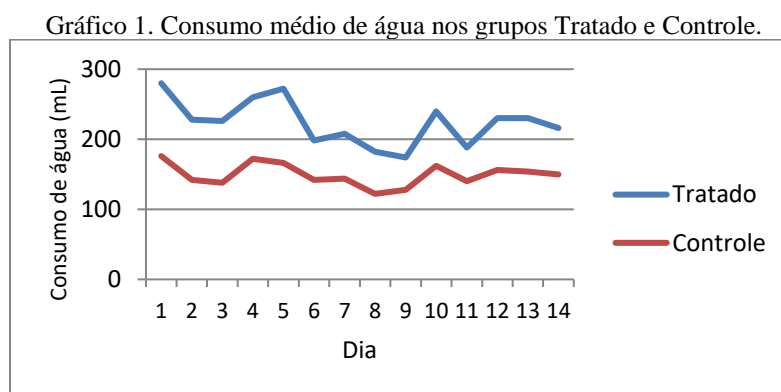
A toxicidade oral aguda do extrato etanólico bruto das partes aéreas da *Waltheria viscosissima* A.St. Hil. foi investigada em ratas Wistar (n=6), tratadas com a dose de 2000 mg/kg do EEBWv. por via oral (gavagem), que sobreviveram sem exibir alterações significativas para registro até o final do período de observação (14 dias).

3.2 TRIAGEM COMPORTAMENTAL

Não foram observadas alterações comportamentais nas ratas tratados com EEBWv na dose de 2000 mg/kg nas 24 horas após administração ou durante os demais 13 dias de observação.

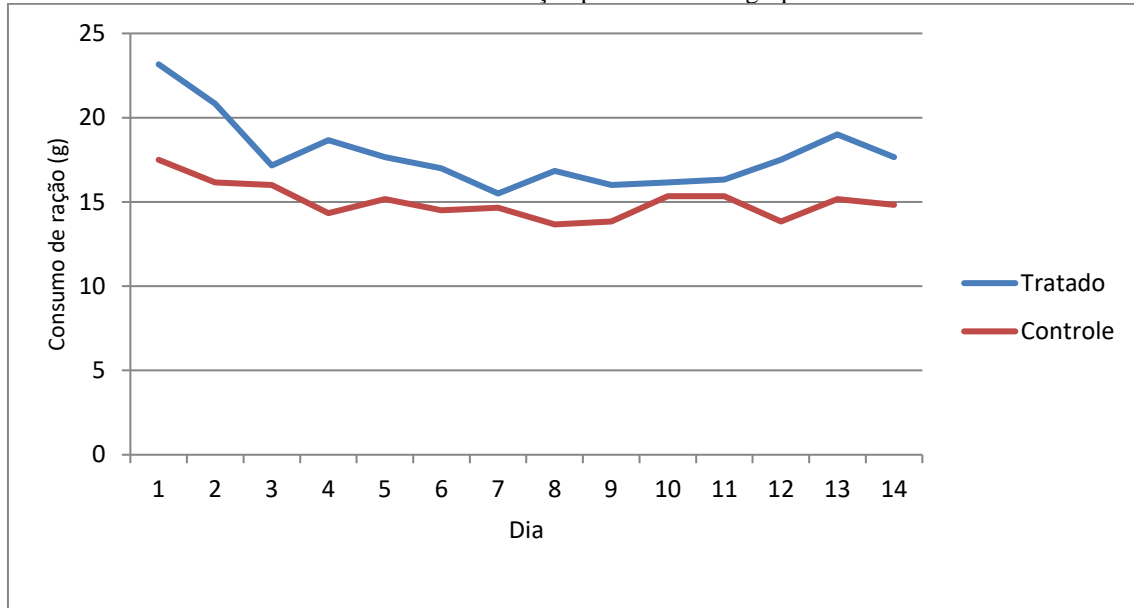
3.3 CONSUMO DE ÁGUA E INGESTA DE ALIMENTOS

Houve diferença significativa entre os grupos no consumo de água e de ração (P-valor < 0,05), tendo o grupo tratado maior consumo médio de água, como também maior consumo médio de ração (Gráficos 1 e 2).



Fonte: Rodrigues LTD, et al., 2022.

Gráfico 2. Consumo médio diário de ração por animal nos grupos Tratado e Controle.

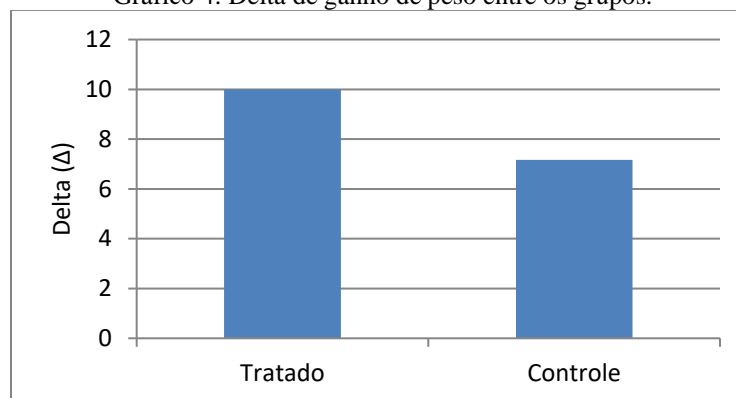


Fonte: Rodrigues LTD, et al., 2022.

3.4 EVOLUÇÃO PONDERAL

Ao longo do tempo, ocorreu ganho de peso significativo nos dois grupos (P-Valor < 0,05) com taxa de crescimento semelhante. Não houve diferença estatisticamente significativa na variação dos pesos entre a semana zero e a segunda semana entre os grupos (delta de ganho de peso) (P-valor de 0,369), segundo o teste de Mann-Whitney (Gráfico 3 e Gráfico 4).

Gráfico 4. Delta de ganho de peso entre os grupos.



Fonte: Rodrigues LTD, et al., 2022.

3.5 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A Tabela 1 apresenta os parâmetros hematológicos por grupos Tratado e Controle. Nenhum destes parâmetros apresentou diferenças estatisticamente significativas (P-Valor \geq 0,05).

Tabela 1. Comparação dos parâmetros hematológicos nos grupos Tratados e Controle.

Hematológicos	Controle		Tratado		P-Valor
	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	
WBC	1,07	5,70±5,32	3,80	4,12±1,07	0,124
LYM%	5,49	50,60±49,64	53,20	54,74±5,49	0,119
MID%	1,17	11,10±11,16	11,40	11,20±1,17	0,917
GRAN%	6,09	38,60±39,30	36,00	34,04±6,09	0,138
LYM#	0,61	2,80±2,58	2,00	2,18±0,61	0,322
MID#	0,08	0,60±0,56	0,40	0,42±0,08	0,108
GRAN#	0,50	2,40±2,18	1,40	1,52±0,50	0,070
RBC	0,13	7,34±7,36	7,22	7,29±0,13	0,354
HGB	0,49	13,30±13,40	13,10	12,94±0,49	0,124
HCT	1,18	36,30±36,24	36,10	36,52±1,18	0,698
MCV	1,11	49,80±49,24	49,60	50,16±1,11	0,246
MCH	0,93	17,90±18,14	18,20	17,74±0,93	0,444
MCHC	2,42	37,00±36,94	36,20	35,44±2,42	0,421 M
RDW CV	0,82	12,90±12,90	12,80	12,84±0,82	0,690 M
RDW SD	3,39	29,90±30,24	30,70	30,98±3,39	0,652
PLT	72,98	837,00±799,20	864,00	864,60±72,98	0,245
MPV	0,39	5,60±5,56	5,30	5,42±0,39	0,541
PDW	0,57	7,10±6,98	6,80	6,86±0,57	0,744
PCT	0,06	0,42±0,44	0,44	0,46±0,06	0,586
PLCR	1,56	3,30±3,48	2,40	3,12±1,56	0,648
PLCC	15,36	23,00±27,40	22,00	26,80±15,36	0,939

M: Teste de Mann-Whitney; DP: desvio padrão; WBC: leucócitos; LYM%: percentual de linfócitos; MID%: percentual de outros tipos de leucócitos não classificadas como linfócitos ou granulócitos; GRAN%: percentual de granulócitos; LYM#: número de linfócitos; MID#: número de outros tipos de leucócitos não classificadas como linfócitos ou granulócitos; GRAN#: número de granulócitos; RBC: contagem de hemácias; HGB: hemoglobina; HCT: hematócrito; MCV: volume corpuscular médio das hemácias; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW CV: amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação; RDW SD: amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão; PLT: contagem de plaquetas (103/uL); MPV: volume plaquetário médio (fL); PDW: amplitude de distribuição volumétrica das plaquetas; PCT: massa plaquetária/plaquetócrito; PLCR: *platelet-large cell ratio*, percentual de plaquetas grandes; PLCC: *platelet large cell count*: contagem de plaquetas grandes.

Fonte: Rodrigues LTD, et al., 2022.

3.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Pode-se observar na Tabela 2 que os únicos parâmetros que apresentaram diferença significativa por grupos Tratados e Controle foram as proteínas (PT) e Globulina (P-Valor < 0,05), que foram maiores no grupo tratado em relação ao controle.

Tabela 2. Comparação dos parâmetros bioquímicos nos grupos Tratados e Controle

Bioquímicos	Controle			Tratado	
	Mediana	Média±DP	Mediana	Média±DP	P-Valor
PT	6,04	6,05±0,21	6,78	6,72±0,23	< 0,001 ^t
ALB	3,15	3,58±0,92	3,03	3,09±0,43	0,589 ^M
Glicose	194	192,67±35,30	179,50	174,83±18,85	0,301 ^t
Ácido úrico	1,49	1,52±0,65	2,46	2,30±0,59	0,055 ^t
Globulina	2,91	2,47±0,83	3,78	3,62±0,31	0,040 ^M
Magnésio	2,47	2,46±0,31	2,30	2,24±0,23	0,204 ^t
Colesterol	59,50	59,677,31	66,00	68,83±13,84	0,182 ^t
Triglicerídeos	33,00	33,00±10,88	12,50	15,00±11,47	0,019 ^t
Uréia	55,50	55,00±7,80	41,00	40,83±8,21	0,012 ^t
Creatinina	0,39	0,40±0,04	0,36	0,38±0,06	0,586 ^t
ALT	0,39	0,40±0,04	0,36	0,38±0,06	0,974 ^t
AST	137,00	167,83±93,62	128,00	141,17±31,04	0,523 ^t
FAL	191,00	214,00±92,70	173,50	218,33±127,67	0,948 ^t

DP : desvio padrão; M = Teste de Mann-Whitney; t = Teste t-Student ; PT: proteínas totais; ALB: albumina; ALT: alanina aminotransferase (TGP); AST: aspartato aminotransferase (AST); FAL: fosfatase alcalina.

Fonte: Rodrigues LTD, et al., 2022.

3.7 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO

O exame macroscópico dos órgãos vitais: coração, pulmão, fígado, estômago e rins dos animais do estudo, não apresentou alterações dignas de nota. Quanto ao peso, os únicos órgãos que apresentaram diferença significativa segundo o teste t-Student foram: fígado, rim direito e rim esquerdo, que apresentaram um peso maior no grupo tratado em relação ao grupo controle. Na avaliação microscópica, também não foram evidentes alterações entre os grupos tratados e controle. Pode-se observar que em nenhum animal do grupo controle e do grupo tratado ocorreu diferença significativa na razão peso do órgão por peso corporal (Tabela 2).

Tabela 2. Razão do peso do órgão por peso corporal para os grupos Controle e Tratado (Valores multiplicados por 103)

Órgão	Controle (x10 ³)		Tratado (x10 ³)		Mann-Whitney P-Valor
	Média	DP	Média	DP	
Pulmão	9,21	2,64	10,31	1,86	0,589
Coração	4,42	0,40	11,30	16,6	0,310
Fígado	31,07	4,16	32,73	3,50	0,485
Rim direito	3,96	0,25	4,10	0,33	0,818
Rim esquerdo	3,90	0,31	3,95	0,28	0,485
Baço	2,44	0,19	2,40	0,27	0,937
Estômago	7,07	0,56	6,53	0,31	0,093

Fonte: Rodrigues LTD, et al., 2022.

4 DISCUSSÃO

Plantas medicinais são usadas há muitos séculos para tratar diversas doenças. A Organização Mundial de Saúde (OMS) encoraja o adequado uso etnomedicinal, o que requer avaliações de segurança das plantas medicinais, incluindo estudos científicos. O presente estudo

foi conduzido para avaliar a toxicidade aguda (dose única) do extrato etanólico bruto das partes aéreas da *Waltheria viscosíssima* em modelo animal conforme preconizado pela OECD 423, visto que não foi encontrado na literatura nenhum estudo não clínico sobre a toxicidade do referido extrato (SALEEM U, et al., 2017; ZAINAL Z, et al., 2020).

Durante os experimentos realizados em nosso estudo, não houve morte ou algum animal apresentou sinais clínicos de toxicidade. Considerando os resultados registrados no ensaio de toxicidade aguda oral em relação ao consumo de água e de ração, observou-se diferença significativa (P -valor $< 0,05$) entre os grupos tratado e controle, tendo o grupo tratado apresentado maior consumo médio de água como também maior consumo médio de ração, o que pode ser justificado pela diferença de peso corporal inicial entre os grupos. Portanto, não é possível estabelecer, a princípio, uma relação entre a alteração no consumo de água e a administração aguda do EEBWv. Na análise da variação dos pesos entre os grupos no dia zero e o último dia do experimento (delta de ganho de peso, gráfico 4), não houve diferença estatisticamente significativa (P -valor = 0,369) entre os grupos.

Na toxicidade aguda não clínica, os sinais de toxicidade são relacionados com redução na massa corporal, além da redução do desenvolvimento ponderal dos animais experimentais. Também são considerados sinais de toxicidade a alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas. A determinação desses parâmetros é importante no estudo de segurança de um produto com fins terapêuticos, já que adequada ingestão de água e nutrientes é essencial para o bom funcionamento do organismo dos animais e, conseqüentemente, para uma resposta aceitável à droga testada. (ABID R e MAHMOOD R, 2019; KALE OE, et al., 2019).

Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração plasmática de proteína total e globulina nos animais tratados com o EEBVv, quando comparados com o controle, fato possivelmente justificado pela diferença de peso entre os animais tratados e os controles (animais tratados possuíam peso corporal maior do que os controles), e reforçado pela ausência de alterações histopatológicas nos órgãos (incluindo o fígado) dos animais tratados, assim como na ausência de diferenças estatisticamente significativas na razão do peso do órgão por massa corporal. Este aumento nas concentrações de proteína e globulina pode ser um indicador de ausência de dano/doença hepática e, conseqüentemente, capacidade de síntese hepática preservada.

Não foram observadas outras alterações significativas nos valores de ácido úrico, glicose, albumina, magnésio, colesterol, triglicerídeos, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) nem fosfatase alcalina. O fígado é o

órgão primário do metabolismo para desintoxicação e distribuição de agentes externos, cujo papel de síntese ou excreção para proteínas, albumina, globulina e bilirrubina é reduzido se o órgão é sobrecarregado. O nível total de proteínas séricas pode aumentar em casos de desidratações e infecções (causando um aumento na concentração de imunoglobulinas), enquanto uma diminuição pode ser causada devido a uma síntese deficiente de proteínas, excesso de hidratação, má absorção ou hipogamaglobulinemia (NJINGA NS, et al., 2020).

No presente estudo não foram observadas alterações significativas na ureia, creatinina, ácido úrico e eletrólitos entre os grupos. A eliminação dos resíduos metabólicos e a regulação de água e eletrólitos são fundamentais à manutenção da homeostase. Ureia e creatinina são produtos nitrogenados não proteicos que precisam ser continuamente removidos. O sistema renal exerce papel essencial na realização dessas funções e alterações nestes resíduos poderiam indicar toxicidade renal, que não foi evidenciada em nosso estudo (NJINGA NS, et al., 2020). Também não houve alterações significativas nas dosagens de lipídeos que permitissem indicar um possível evento tóxico relacionado com a administração aguda do EEWv. O sistema hepatobiliar apresenta várias funções conhecidas, entre as quais as excretoras, metabólicas, secretoras, armazenamento, coagulação sanguínea e circulatórias e, segundo os dados obtidos, não houve registro de efeito hepatotóxico em decorrência da administração oral aguda do EEBWv. A avaliação laboratorial das dislipidemias pelas dosagens de lipídeos como colesterol total e triglicérides é de grande importância pois as alterações nesses parâmetros associados a outras variáveis podem indicar doenças do sistema cardiovascular e pancreáticas (NJINGA NS, et al., 2020). Dano hepático causado por substâncias hepatotóxicas podem resultar na elevação da ALT e AST.

Não existiram alterações estatisticamente significativas entre os grupos no nível de magnésio assim como em nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados, o que sugere que a administração aguda do extrato não induz anemia, plaquetopenia nem leucopenia em ratos. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: leucócitos (WBC), linfócitos (LYN), granulócitos (GRAN), hematócrito (HCT), plaquetas (PLT), hemoglobina (HGB), hemoglobina corpuscular média (MCH), contagem de células vermelhas (RBC), volume corpuscular médio (MCV), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume plaquetário médio (MPV), plaquetócrito (PCT), percentual de plaquetas grandes (PLCR), amplitude de distribuição volumétrica das plaquetas (PDW) e amplitude de distribuição de glóbulos vermelhos (RDW). Parâmetros hematológicos são marcadores sensíveis de poluentes ambientais ou estresse tóxico. Mudanças no sistema hematopoiético são preditivas de toxicidade em animais. As plaquetas sanguíneas desempenham um papel essencial na

coagulação. A contagem de leucócitos é usada como indicadores de resposta do sistema imunológico a substâncias tóxicas exógenas, incluindo plantas (PORWAL M, et al., 2017; NJINGA NS, et al., 2020).

Em complemento, a administração aguda do extrato não alterou a contagem diferencial de leucócitos nos animais. Os leucócitos são os elementos figurados incolores do sangue circulante que exercem função essencial no mecanismo de defesa do organismo contra agressões infecciosas ou de outra origem. Eles podem ser subdivididos em três classes: granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), linfócitos e monócitos. A porcentagem relativa destas células pode fornecer informações sobre diferentes condições patológicas (PORWAL M, et al., 2017; NJINGA NS, et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

Baseado nos critérios contidos no Guia para Testes de Toxicidade Oral endossado pela OECD, o extrato etanólico bruto das partes aéreas da *Waltheria viscosissima* possui toxicidade aguda via oral baixa, enquadrando-se na Classe 5 (substância com DL50 superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg). Conforme as normativas, testes sequenciais não clínicos com doses repetidas e clínicos devem ser conduzidos no futuro, para o uso terapêutico seguro deste extrato.

REFERÊNCIAS

- ABID R, MAHMOOD R. Acute and sub-acute oral toxicity of ethanol extract of *Cassia fistula* fruit in male rats. *Avicenna J Phytomed.* 2019;9(2):117-125.
- ALMEIDA RN, OLIVEIRA TML. Triagem farmacológica comportamental. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 11, p. 131-137, 2006.
- BOVINI MG, et al. Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, 52, 81, pp. 17-47, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos** – 2013. Brasília, 2013.
- CARVALHO ACB, et al. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. *J Ethnopharmacol.* 2018 Feb 15;212:29-35.
- DUTRA RC, et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res.* 2016 Oct;112:4-29.
- ESTEVES GL. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Malvaceae, *Rodriguésia*. 57, 2, pp. 205-206, 2006.
- FERREIRA MDL, et al. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia [online]*. 2019, v. 29, n. 5, pp. 582-590.
- GASTON TE, et al. "Natural" is not synonymous with "Safe": Toxicity of natural products alone and in combination with pharmaceutical agents. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020 Jun;113:104642.
- GROCHOWSKI DM, et al. A Review on the Dietary Flavonoid Tiliroside. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2018 Sep;17(5):1395-1421.
- KALE OE, et al. Subacute and subchronic oral toxicity assessments of *Acridocarpus smeathmannii* (DC.) Guill. & Perr. root in Wistar rats. *Toxicol Rep.* 2019;6:161-175.
- NJINGA NS, et al. Toxicity assessment of sub-acute and sub-chronic oral administration and diuretic potential of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces. *Heliyon.* 2020 Sep 21;6(9):e04853.
- OECD (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.
- PORWAL M, et al. Evaluation of Acute and Subacute Oral Toxicity Induced by Ethanolic Extract of *Marsdenia tenacissima* Leaves in Experimental Rats. *Scientia Pharmaceutica.* 2017; 85(3):29.

RIBEIRO VP, et al. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharm Biol.* 2018;56(1):253-268.

ROLIM YM. Alcaloides e glicosídeo flavonoídico de *Waltheria viscosissima* A. St. Hil – Malvaceae. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Paraíba, 2015; 85 p.

SALEEM U, et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. *Toxicol Rep.* 2017 Oct 31;4:580-585.

SEIDEL V. Plant-Derived Chemicals: A Source of Inspiration for New Drugs. *Plants.* 2020; 9(11):1562.

SOUSA AP, et al. Analysis of the toxicological and pharmacokinetic profile of Kaempferol-3-O- β -D-(6"-E-p-coumaryl) glucopyranoside - Tiliroside: in silico, in vitro and ex vivo assay. *Braz J Biol.* 2021 Jun 21;83:e244127.

TONHOLO DR. **Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* de moléculas potencialmente terapêuticas.** Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 43. 2018.

THOMFORD NE, et al. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1578.

VASQUES CAR, et al. Muscarinic agonist proprieties of the hydrobutanol extract from aerial parts of *Waltheria viscosissima* St. Hil. (Streuliaceae) in rats. *Phytoterapy Research.* 13, p. 312-317, 1999.

WANG DEHE, et al. MaGenDB: um hub genômico funcional para plantas Malvaceae. *Pesquisa de ácidos nucleicos* vol. 48,D1 (2020): D1076-D1084.

ZAINAL Z, et al. Acute and Subchronic Oral Toxicity of Oil Palm Puree in Sprague-Dawley Rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(10):3404.