

Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae)

Simoni Lobato da SILVA^{1*}, Alessandra Azevedo do NASCIMENTO¹, Edson Fábio Brito RIBEIRO¹, Renata Barbosa RIBEIRO¹, Cleiziane Melo ALVES¹, André Mendonça dos SANTOS¹, Aurélio Pinheiro Rodrigues BURMANN², Raimundo de Almeida MIRA NETO¹

¹ Universidade Federal do Amapá, Laboratório de Experimentação Animal, Campus Universitário Marco Zero do Equador, Rodovia Juscelino Kubitschek, KM-02, Jardim Marco Zero, CEP 68.903-419, Macapá, AP, Brasil.

² Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá, Rua Tancredo Neves, 1118, São Lázaro, 68908-530, Macapá, AP, Brasil

* Autor correspondente: simone2010_ls@hotmail.com

RESUMO

Parahancornia amapa é uma espécie endêmica do Estado do Amapá, na região Amazônica. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do extrato metanólico das cascas do caule de *P. amapa*. Diferentes concentrações do extrato foram adicionadas aos camarões de salmoura (*Artemia salina*) e a concentração letal média (CL₅₀) foi avaliada. Os resultados desse ensaio indicaram que o extrato não era tóxico. A toxicidade aguda foi estudada em ratos Wistar (machos e fêmeas) após dose única (2000 mg kg⁻¹) por gavagem. Ingestão de água e comida, peso corporal, alterações comportamentais e mortalidade foram anotados. Amostras de sangue foram coletadas para medições de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os animais foram eutanasiados e seus órgãos (coração, rins, fígado e pulmões) submetidos à análise macroscópica e histopatológica. Não houve mortalidade ou qualquer sinal de mudança de comportamento ou toxicidade observada após a administração oral do extrato. No entanto, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) sobre o consumo de água de ratas tratadas com o extrato de *P. amapa* (127,64 mL) quando comparadas ao grupo controle (101,93 mL). Um aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem das plaquetas também foi observado tanto em ratos machos ($288,00 \times 10^3 \text{ mm}^3$) quanto em fêmeas ($220,83 \times 10^3 \text{ mm}^3$, respectivamente) que receberam o extrato quando comparados com seus respectivos grupos controle ($128,33 \times 10^3 \text{ mm}^3$; $109,50 \times 10^3 \text{ mm}^3$). Alterações histopatológicas não foram relacionadas ao tratamento com extrato em nenhum dos órgãos analisados. Estes resultados sugerem que o extrato de *P. amapa* tem um efeito geral não-tóxico.

PALAVRAS-CHAVE: Amapazeiro, Fitoterapia, Bioprospeção.

Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae)

ABSTRACT

Parahancornia amapa is an endemic plant species of Amapá in the Amazon region. This study aimed to evaluate the acute toxicity of methanol extract of the bark of *P. amapa*. Different concentrations of the extract were added to the brine shrimps (*Artemia salina*) and 50% lethality concentration (LC₅₀) was assessed. The results of the brine-shrimp assay indicated that the extract was found to be non-toxic. Acute toxicity was studied in Wistar rats (males and females) after single dose (2000 mg kg⁻¹) by oral gavage. Food and water intake, body weight, general behavioral changes and mortality of animals were noted. Blood samples were collected for haematological and serum biochemical parameters measurements. Subsequently, they were euthanized and their organs (heart, kidneys, liver and lungs) subjected to macroscopic and histopathological analysis. There was no mortality or any sign of behavioral change or toxicity observed after oral administration of the extract. Nevertheless, it was observed a significant increase ($p < 0.05$) on water intake of female rats treated with the extract of *P. amapa* (127.64 mL) when compared to control group (101.93 mL). A significant increase ($p < 0.05$) in platelet count was also observed in both male ($288.00 \times 10^3 \text{ mm}^3$) and female ($220.83 \times 10^3 \text{ mm}^3$) rats that received the extract when compared to their respective control groups ($128.33 \times 10^3 \text{ mm}^3$; $109.50 \times 10^3 \text{ mm}^3$). Histopathological changes were not related to the treatment with extract in any of the analyzed organs. These results suggest that *P. amapa* extract has a non-toxic effect.

KEYWORDS: Amapazeiro, Phytotherapy, Bioprospecting.

INTRODUÇÃO

A espécie *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae) é uma planta frutífera endêmica do Estado do Amapá distribuída no planalto e florestas inundadas da Região Amazônica. Árvore de grande porte, com 40 a 50 metros de altura, seus frutos são grandes e comestíveis servindo de alimentos aos macacos que vivem nas copas das árvores (Morais *et al.* 1995). *Parahancornia amapa* é conhecida popularmente como “amapá”, “amapazeiro” ou “mapá”, possui um látex denominado de “leite de amapá” empregado pelas comunidades locais para o tratamento de feridas e hematomas na forma de emplastro (cataplasma ou compressa), consumido também como bebida misturada ao mel de abelha em partes iguais, para o tratamento da asma, bronquites e fraqueza física. Tanto suas cascas como seu látex são conhecidos ainda pelos nativos como tônico e anti-sífilis (Berg 1982). O *Parahancornia amapa*, também, possui propriedade analgésica e anti-inflamatória, potencial cicatrizante além de ser utilizado em afecções do trato digestório (Monteles e Pinheiro 2007).

Estudos fitoquímicos desta espécie relatam a presença de vários compostos nas raízes, látex, cascas. Sendo que, das raízes de *P. amapa* foram isolados e identificados ésteres 3- β -*O*-acil lupeóis, os esteróides β -sitosterol, stigmaterol e β -sitosterona e os triterpenos β -amirina, α -amirina, lupeol e seus derivados acetilados (Carvalho *et al.* 2001). Do látex de *P. amapa* as frações obtidas com hexano e diclorometano forneceram misturas de 3-*O*-acillupeol e triterpenos, confirmando resultados de estudos já realizados. No extrato metanólico identificou-se grande quantidade de carboidratos, metilmioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo (Carvalho *et al.* 2008). Dos extratos diclorometano da casca e do látex de um espécime de *P. amapa* foram isoladas e identificadas substâncias como os triterpenos pentacíclicos lupeol, β -amirina e α -amirina, seus derivados acetilados, ácidos alifáticos e outros ésteres 3-*O*-acil-lupeol (Sobrinho *et al.* 1991).

Além dos estudos fitoquímicos relatados anteriormente, verifica-se que do extrato diclorometânico dos galhos foram isolados o β -sitosterol, estigmaterol, além de triterpenóides pentacíclicos, α -amirina, β -amirina, lupeol e friedelina e do extrato metanólico das cascas foi isolado o alcaloide indólico isositsiriquina (Henrique *et al.* 2014). É importante destacar, também, que o *P. amapa* apresentou bioatividade da fração metanólica do látex sobre o desenvolvimento de *Rhodnius nasutus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) em condições de laboratório, sendo tais efeitos, na sua maioria tóxicos (Lopes *et al.* 2014).

Diante do exposto e visando garantir a segurança do uso da espécie, esse estudo objetiva avaliar o efeito toxicológico agudo do extrato bruto metanólico do *Parahancornia amapa* (EMPA) em modelo animal.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amapá (CEP/UNIFAP), com o número 006A/2011 de acordo com o que preconiza a Resolução de nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares.

Coleta do material botânico

As cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Huber) Ducke (Apocynaceae), conhecida como “amapazeiro”, foram coletadas no município de Macapá, Estado do Amapá, Brasil, em novembro de 2011, durante o período de estiagem. Uma excisada foi depositada no herbário do Instituto de Pesquisa do Estado do Amapá para fins de referência sob o número de registro HAMAB-18350.

Preparação do extrato metanólico das cascas do caule de *P. amapa* (EMPA)

Para a obtenção do EMPA as cascas do caule foram desidratadas em estufa de ar circulante (Mod. 330, FANEM, Carandiru, SP, BR) a uma temperatura de 45 °C e posteriormente trituradas em moinho de facas (tipo WILLEY) até a pulverização (1000 g). Em seguida, foi realizada a maceração do pó em metanol por um período de 10 dias. A solução extrativa foi filtrada sob vácuo e o concentrado foi obtido em rotavapor (Vinatoru 2001; Ferri 1996) sob pressão reduzida a 78 rpm a uma temperatura máxima de 60 °C, obtendo-se 190 g (19% de rendimento) de uma pasta de coloração marrom-avermelhada.

Animais

No ensaio preliminar de toxicidade, foram utilizadas larvas de *Artemia salina* L., um microcrustáceo da classe Anostracea, (Brine Shrimp Test), na forma de metanúplio, utilizando-se a Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (Lopes *et al.* 2002). Para o ensaio de toxicidade aguda pré-clínica foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 150 e 250 g, todos provenientes do Biotério do Laboratório de Central de Saúde Pública do Estado do Amapá (LACEN-AP). Os animais foram aclimatados às condições do biotério local por sete dias antes dos ensaios experimentais, sob temperatura de 23±2 °C e ciclos de claro e escuro de 12 horas, sendo alimentados com ração para animais de laboratório (Purina–Nuvilab CR-1 autoclavável; Nuvital, SP, Brasil) e com água *ad libitum*.

Bioensaio com *Artemia salina* L. (Brine Shrimp Test)

Para este teste, cerca 25 mg de cistos de *A. salina* L. foram incubados em um recipiente que possui dois compartimentos separados por uma parede vazada, contendo água do mar

artificial (NaCl 23 g L^{-1} , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 11 g L^{-1} , Na_2SO_4 4 g L^{-1} , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,3 g L^{-1} , KCl 0,7 g L^{-1}) à temperatura de 20 a 30 °C, sendo utilizado Na_2CO_3 para ajustar o pH e evitar a morte das larvas. A incidência de luz de uma lâmpada de 40 watt em apenas um dos compartimentos do recipiente estimulava a migração dos metanúplios (fototropismo), os quais eram obtidos após a eclosão dos cistos, com auxílio de uma pipeta Pasteur, após 24 horas de incubação (Mclaughlin *et al.* 1998; Meyer *et al.* 1982). Os ensaios foram realizados em triplicata, buscando-se a determinação da relação dose-resposta. Havia um grupo controle, apenas com a água do mar artificial, e os grupos teste, água do mar artificial com EMPA nas concentrações de 1000, 750, 500, 300, 100, 30, 10, 3 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em cada tubo foram colocadas 10 larvas de *A. salina* L., incluindo o controle, sendo completado até o volume final de 1 mL com água do mar artificial. Após 24 horas, foram contabilizadas larvas mortas e vivas e assim calculada a CL_{50} , determinada pelo método estatístico de Probits (Parra *et al.* 2001; Mclaughlin *et al.* 1998). A classificação do extrato seguiu os critérios estabelecidos por Meyer *et al.* (1982), da seguinte forma: “tóxico” se $\text{CL}_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e “não tóxicos” se $\text{CL}_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ensaio Toxicológico pré-clínico agudo (dose fixa)

O EMPA foi dissolvido com etanol e diluído em solução fisiológica (SF) a 0,9% e administrado, por gavagem, em um grupo de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) submetidas a jejum de 12 horas; na dose de 2 g kg^{-1} , num volume de 10 mL kg^{-1} . O grupo controle (6 machos e 6 fêmeas) recebeu o mesmo volume de SF a 0,9% (salina). Após a administração da droga na dose citada anteriormente por via oral, realizava-se a observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, a cada 4 horas, até completar 24 horas e diariamente durante 14 dias, sendo avaliadas as seguintes variáveis no “Screening” hipocrático: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto de cauda, contorção trem posterior, endireitamento e retirada (cauda), tônus muscular, força de agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, estimulações, *Straub*, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, alteração na cor da urina e diarreia.

Os resultados foram avaliados através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 (Testes com anotação normal .0., a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4; Teste com anotação normal .4., a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento). Diariamente, foram observados o consumo de água (mL), a ingestão de alimento (g) e a evolução ponderal (g). No 14º dia, os animais que não foram a óbito, e os animais dos grupos controle

foram submetidos à retirada de material biológico (sangue), eutanasiados e necropsiados.

Exames Laboratoriais

No 14º dia foram retiradas amostras de sangue através de punção intracardiaca para análise laboratorial de variáveis hematológicas e bioquímicas. Em seguida, os órgãos foram retirados, analisados macroscopicamente, buscando-se possíveis alterações na estrutura, rigidez ou coloração das superfícies e, posteriormente, pesados. Como não foram identificadas alterações macroscópicas, 30% dos órgãos foram encaminhados para o exame histopatológico para avaliação da integridade tecidual dos seguintes órgãos extirpados: fígado, pulmões, coração e rins. As principais variáveis investigadas foram: lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose e apoptose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose; de acordo com o protocolo da RES/ANVISA nº 90 (Brasil 2004).

Análise estatística

No bioensaio frente *A. salina*, para obtenção dos valores de CL_{50} foi utilizada a análise PROBIT, através do software Microcal Origin, adotando-se um Intervalo de Confiança (IC) de 95%. No estudo de toxicidade aguda os resultados numéricos foram expressos na forma de média \pm desvio padrão da média. Os valores obtidos e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas quando submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer quando o número de grupos era maior que 2. No caso da análise entre grupos de ratos (machos e fêmeas) tratados e não tratados com o EMPA, recorreu-se ao teste “t” de Student não pareado (unpaired t test). Para tal, considerou-se, a princípio, a hipótese nula de que todas as amostras seriam estatisticamente semelhantes, adotando-se IC de 95%, com nível de significância estatística (p) menor que 5% ($p < 0,05$) para rejeitar a hipótese nula.

RESULTADOS

No bioensaio com *Artemia salina*, para averiguar provável toxicidade preliminar, o EMPA apresentou CL_{50} de 7647,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com 95% de confiança e $p < 0,05$, o que, segundo critérios estabelecidos por Meyer *et al.* (1982), indica que o extrato é “não tóxico”. Sendo assim, o ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica (Cavalcante *et al.* 2001).

No ensaio toxicológico pré-clínico agudo (dose fixa) a administração da dose de 2 g kg^{-1} do EMPA em Ratos *Wistar* machos e fêmeas não provocou nenhuma alteração

aparente fora dos parâmetros comportamentais analisados, nos intervalos estabelecidos, quando comparados aos obtidos com o grupo controle (salina). Não ocorreu morte seguida à administração, também não ocorreu morte durante o período de análise (14 dias). Portanto, as observações não mostraram sinais de toxicidade como perda de massa corporal, inibição do crescimento, alterações comportamentais e clínicas graves quando comparado aos grupos controle. Sendo assim, não houve cálculo da DL₅₀.

Em relação à evolução ponderal, a análise não mostrou diferença significativa entre os grupos controle (salina) e EMPA ($p > 0,05$, ANOVA seguido do teste de Tukey-Kramer), sendo que os dois ganharam peso relativo ao longo das duas semanas de observação. Percebeu-se ligeira redução de ganho de massa na primeira semana nos animais que receberam EMPA, quando comparadas ao grupo controle (salina). No entanto, essa redução foi revertida ao término do experimento (14 dias). Após esse período, houve ganho de massa em todos os grupos e não houve diferenças significativas entre as massas médias finais.

Realizou-se a ANOVA de única via seguido do teste de Tukey-Kramer entre a diferença de peso dos animais no início da avaliação, no 8º e no 14º dias. Observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos controle (solução salina) e o teste (EMPA); tanto do grupo de machos como de fêmeas. Confirmando assim, que após 14 dias de avaliação, os pesos médios dos ratos do grupo controle e teste apresentaram-se estatisticamente semelhantes.

Quando analisados o consumo de água (mL) e alimento (g), nenhuma alteração significativa foi detectada entre os grupos controle e teste, tanto na primeira como na segunda semana no grupo de ratos machos (ANOVA de única via seguido do teste de Tukey-Kramer). Porém, avaliando-se o consumo de água entre os grupos controle e teste de animais fêmeas foi registrada uma diferença significativa ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Não foram detectadas alterações na estrutura, rigidez ou coloração das superfícies dos órgãos avaliados

TABELA 1. Consumo de água no período de 14 dias (média ± desvio padrão) de ratos Wistar machos (M) e fêmeas (F) grupos tratados agudamente com EMPA (Extrato Metanólico de *P. amapa*) (2 g kg⁻¹) e grupos teste tratados com salina (controle) (ANOVA de única via seguido do teste de Tukey-Kramer, $p < 0,05$). * $p < 0,05$.

Variável	Consumo de água (mL)
Controle (M)	173,86 ± 24,06
EMPA (M)	166,64 ± 15,40
Valores de "p"	$p > 0,05$
Controle (F)	127,64 ± 23,63
EMPA (F)	101,93 ± 20,26
Valores de "p"	$p < 0,05$

macroscopicamente, bem como, não foram detectadas diferenças significativas entre as massas do fígado, rins, pulmões e coração dos grupos de ratos Wistar macho e fêmea tratados com EMPA quando comparados ao grupo controle (Tabela 2). Na análise histopatológica não foi observada nenhuma alteração que comprometesse a integridade tecidual dos órgãos extirpados.

Quanto às variáveis bioquímicas analisadas não foram observadas alterações estatisticamente significativas (Tabela 3). Nos resultados hematológicos relacionados com a série eritrocitária, leucocitária e megacariocitária, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na contagem de plaquetas do grupo teste, tanto de machos quanto de fêmeas, quando comparados com o grupo controle (Tabela 4).

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados do bioensaio com *A. salina*, o EMPA, nas concentrações testadas, no período de exposição de 24 h, apresentou CL₅₀ de 7647, 62 µL mL⁻¹, considerando IC de 95% e, de acordo a classificação adotada, sugere-se que o extrato, a partir desse ensaio preliminar, não apresenta toxicidade, porém, possui provável bioatividade. Verificou-se, através do ensaio toxicológico pré-clínico agudo (dose fixa), que o EMPA não apresentou efeito tóxico aparente, após a administração de 2 g kg⁻¹ em ratos Wistar machos e fêmeas, indicando que o extrato administrado agudamente é pouco tóxico, uma vez que não foram observados sintomas adversos nem mortalidade. Estes resultados convergem com a ausência de relatos de efeitos tóxicos decorrentes do uso empírico do *P. amapa*.

O EMPA não provocou nenhuma alteração na atividade geral e consciência dos animais, tampouco influenciou na coordenação motora ou nos reflexos, além de não influenciar outras atividades fisiológicas relacionadas com Sistema Nervoso Central (como tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia) ou Autônomo (como lacrimação, respiração, cianose, ptose, salivação, micção, defecação, piloereção, hipotermia); podendo-se dizer que o extrato em questão, a partir das variáveis analisadas, corroborando com o resultado de baixa toxicidade.

Na toxicidade aguda pré-clínica, os sinais de toxicidade sistêmica são definidos considerando a redução na massa corporal, além da redução do desenvolvimento ponderal dos animais experimentais (Tofovic e Jackson 1999; Raza *et al.* 2002; Teo *et al.* 2002). Outros sinais de toxicidade podem se expressar pela alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas (Gonzalez e Silva 2003).

Levando-se em consideração os resultados registrados neste teste, houve diferença significativa (* $p < 0,05$) entre os

TABELA 2. Avaliação da massa relativa (média ± desvio padrão) do coração, pulmões, fígado e rins de ratos (M) e ratas (F) após catorze dias, no teste de toxicidade aguda. Os grupos teste EMPA (Extrato Metanólico do *P. amapa*) (2 g kg⁻¹) e o grupos controle (salina) foram comparados para obtenção do nível de significância (teste “t” de Student, p<0,05).

Órgãos (g)	Controle (M)	EMPA (M)	Valores de “p”	Controle (F)	EMPA (F)	Valores de “p”
Coração	0,31 ± 0,04	0,33 ± 0,02	(p>0,21)	0,33 ± 0,03	0,32 ± 0,07	(p>0,18)
Pulmões	0,41 ± 0,03	0,39 ± 0,04	(p>0,11)	0,45 ± 0,02	0,46 ± 0,01	(p>0,18)
Fígado	3,69 ± 0,20	3,81 ± 0,17	(p>0,48)	3,40 ± 0,02	3,32 ± 0,06	(p>0,42)
Rins	0,65 ± 0,02	0,67 ± 0,05	(p>0,60)	0,62 ± 0,03	0,59 ± 0,05	(p>0,11)

TABELA 3. Níveis séricos de parâmetros bioquímicos em ratos machos (M) e fêmeas (F) tratados com EMPA (Extrato Metanólico de *P. amapa*) (2 g kg⁻¹) e o grupo controle tratado com salina. Dados expressos pela média ± desvio padrão e nível de significância p (teste “t” de Student, p<0,05).

Variáveis bioquímicas	Controle (M)	EMPA (M)	Valores de “p”	Controle (F)	EMPA (M)	Valores de “p”
Colesterol total (mg dL ⁻¹)	64,33 ± 4,22	56,33 ± 5,10	(p=0,43)	46,50 ± 6,12	64,33 ± 2,98	(p=0,08)
Triglicérides (mg dL ⁻¹)	83,83 ± 9,25	86,50 ± 12,26	(p=0,49)	101,67 ± 8,23	79,50 ± 5,54	(p=0,08)
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	7,60 ± 1,87	7,25 ± 2,01	(p=0,77)	7,20 ± 1,32	5,78 ± 1,29	(p=0,39)
Úreia (mg dL ⁻¹)	62,17 ± 9,67	55,00 ± 7,43	(p=0,45)	51,50 ± 6,48	47,00 ± 9,79	(p=0,09)
Creatinina (mg dL ⁻¹)	1,17 ± 0,86	1,08 ± 0,19	(p=0,53)	1,07 ± 0,63	0,92 ± 0,07	(p=0,05)
TGO (UI L ⁻¹)	222,83 ± 13,16	172,33 ± 21,12	(p=0,20)	219,67 ± 26,72	115,00 ± 14,12	(p=0,07)
TGP (UI L ⁻¹)	111,83 ± 21,30	108,50 ± 12,59	(p=0,20)	105,83 ± 12,73	90,00 ± 11,68	(p=0,31)
Fosfatase alcalina (UI L ⁻¹)	282,12 ± 12,25	190,50 ± 27,28	(p=0,11)	131,17 ± 26,12	138,17 ± 18,86	(p=0,69)
Amilase (UI L ⁻¹)	416,00 ± 65,29	572,17 ± 39,92	(p=0,27)	698,50 ± 145,54	601,50 ± 82,12	(p=0,61)
Cálcio (mg dL ⁻¹)	10,13 ± 1,24	11,47 ± 3,32	(p=0,68)	8,93 ± 1,39	11,47 ± 2,39	(p=0,29)
Fósforo (mg dL ⁻¹)	19,42 ± 4,09	17,08 ± 4,43	(p=0,46)	15,18 ± 3,21	12,68 ± 4,98	(p=0,33)
CK-NAC (UI L ⁻¹)	58,00 ± 9,76	56,17 ± 9,21	(p=0,83)	54,67 ± 8,92	41,83 ± 7,36	(p=0,09)
Proteínas Totais (g dL ⁻¹)	5,83 ± 1,06	5,42 ± 1,02	(p=0,43)	5,48 ± 1,98	5,13 ± 1,29	(p=0,50)
Albumina (g dL ⁻¹)	1,65 ± 0,92	1,82 ± 0,73	(p=0,49)	1,77 ± 0,29	1,82 ± 0,67	(p=0,67)
Globulina (g dL ⁻¹)	4,13 ± 1,29	3,60 ± 0,69	(p=0,39)	3,72 ± 1,43	3,42 ± 0,98	(p=0,61)
Relação	0,39 ± 0,09	0,71 ± 0,23	(p=0,26)	0,51 ± 0,07	0,55 ± 0,11	(p=0,77)

grupos controle e teste de ratas (F) quando avaliado o consumo de água. Porém, como nos grupos de ratos machos não foi observada nenhuma alteração significativa quanto a este critério, não é possível estabelecer, a princípio, uma relação entre a alteração no consumo de água e a administração aguda do EMPA.

Além disso, observou-se um aumento significativo (p<0,05) na contagem de plaquetas do grupo de ratos tratado com EMPA, machos e fêmeas, quando comparados com o

grupo tratado com salina e, apesar das alterações na série megacariocitária (plaquetas), não foram observadas outras alterações significativas nas séries eritrocitária e leucocitária que permitissem correlacionar com o número de plaquetas.

A elevação de plaquetas circulantes vem sendo observada em uma variedade de condições fisiológicas e patológicas. As doenças mieloproliferativas são frequentemente acompanhadas por um persistente aumento da contagem de plaquetas, assim como o stress por exercícios acompanhados por um transitório

TABELA 4. Variáveis hematológicas de ratos machos (M) e fêmeas (F) tratados com EMPA (Extrato Metanólico de *P. amapa*) (2 g kg⁻¹) e o grupo controle tratado com salina. Os valores representam a média ± desvio padrão. ***p<0,0001 (Teste “t” de student).

Variáveis Hematológicas	Controle (M)	EMPA (M)	Valores de “p”	Controle (F)	EMPA (F)	Valores de “p”
Hematócrito%	38,93 ± 8,37	36,05 ± 9,92	(p=0,12)	37,12 ± 8,02	34,18 ± 5,75	(p=0,36)
Hemoglobina (g dl ⁻¹)	12,05 ± 1,48	11,42 ± 2,43	(p=0,36)	12,17 ± 1,75	12,23 ± 0,97	(p=0,49)
Chcm (g dl ⁻¹)	31,52 ± 2,28	32,65 ± 4,04	(p=0,05)	32,65 ± 2,98	33,48 ± 4,87	(p=0,56)
Leucócitos (10 ³ mm ⁻³)	20,42 ± 3,09	28,68 ± 4,45	(p=0,01)	19,55 ± 3,03	15,98 ± 3,60	(p=0,59)
Granulócitos (10 ³ mm ⁻³)	8,45 ± 2,63	13,08 ± 1,02	(p=0,08)	10,82 ± 2,92	6,80 ± 2,88	(p=0,43)
Granulocitos (%)	40,32 ± 5,95	46,00 ± 5,37	(p=0,43)	54,40 ± 14,23	37,73 ± 4,94	(p=0,24)
Neutrófilos (%)	34,07 ± 7,43	40,50 ± 6,26	(p=0,34)	49,50 ± 6,27	32,83 ± 5,76	(p=0,23)
Eosinófilos (%)	3,08 ± 0,87	2,83 ± 0,91	(p=0,64)	2,83 ± 0,97	2,67 ± 0,73	(p=0,76)
Basófilos (%)	0,67 ± 0,28	0,50 ± 0,19	(p=0,60)	0,50 ± 0,09	0,67 ± 0,21	(p=0,60)
Linfócitos (10 ³ mm ⁻³)	11,98 ± 2,53	15,60 ± 3,83	(p=0,18)	8,73 ± 2,676	9,22 ± 2,76	(p=0,90)
Linfócitos (%)	59,68 ± 8,20	54,00 ± 4,59	(p=0,43)	46,78 ± 17,37	62,20 ± 8,92	(p=0,29)
Monócitos (%)	2,50 ± 0,92	2,00 ± 0,75	(p=0,55)	1,87 ± 0,69	1,57 ± 0,57	(p=0,46)
Plaquetas (10 ³ mm ⁻³)	128,33 ± 18,23	288,00 ± 29,28***	(p=0,0068)	109,50 ± 23,37	220,83 ± 25,36***	(p=0,0016)

e moderado aumento de plaquetas, e durante o tratamento de algumas anemias (Ogston e Dawson 1969).

A trombocitose associada à anemia ferropriva, sempre foi relatada em adultos e crianças, além de trombocitopenia ocorrentes em estados mais severos da anemia, sendo que, em ambas as condições os valores retornam ao normal após o tratamento com ferro. Estudos em ratos para investigar a relação do ferro com as plaquetas demonstraram que a homeostasia das plaquetas sofre influência com a intensidade e duração da anemia (Choi e Simone 1973). O aumento na contagem de plaquetas promovido pela administração aguda de EMPA pode sugerir que a espécie possua constituintes estimuladores da liberação de trombopoietina, que é o principal regulador fisiológico da produção de plaquetas.

Considerando-se tal estudo e levando em consideração que não foram observadas alterações de outras variáveis hematológicas, tampouco o registro de quadros anêmicos, não é possível correlacionar tais eventos com o aumento significativo do número de plaquetas registrado nesta pesquisa. Além disso, na busca de pesquisas que revelassem a atividade biológica dos compostos farmacologicamente ativos descritos para *P. amapa*, não foram encontrados relatos que descrevam qualquer ligação entre a presença de tais compostos e a indução de trombocitose em modelos experimentais. Assim, fica a expectativa de novos estudos que possam elucidar tal achado hematológico.

A regulação de água e eletrólitos e a eliminação dos resíduos metabólicos são essenciais à manutenção da homeostase. O sistema renal exerce papel de extrema importância na realização dessas funções. No presente estudo não foram

observadas alterações na estrutura e função renais, bem como não foram observadas alterações significativas nos valores de eletrólitos pesquisados.

Outro aspecto importante é a avaliação laboratorial das dislipidemias determinadas pelas dosagens de lipídeos como colesterol total (CT) e triglicerídeos. As alterações dessas moléculas são primordiais para avaliar, juntamente com outras variáveis, doenças do sistema cardiovascular e doenças pancreáticas. Neste trabalho, não foram observadas alterações significativas que permitissem indicar um possível evento tóxico relacionado com a administração aguda do EMPA. Sabe-se, também, que o sistema hepatobiliar apresenta centenas de funções conhecidas, entre as quais as metabólicas, excretoras e secretoras, armazenamento, protetoras, circulatórias e coagulação sanguínea e, segundo os dados obtidos, não houve registro de evento hepatotóxico em decorrência da administração do EMPA.

Deve-se considerar, também, que o músculo cardíaco e o músculo esquelético possuem atividade ou concentração elevada de enzimas e proteínas envolvidas na geração de enzimas e na contração muscular, portanto a dosagem de índices como a creatina-fosfoquinase (CK-NAC) é importante quando se busca analisar a função cardíaca e músculo esquelético e, com base em nossos achados, o uso *P. amapa*, da forma como foi realizado, a princípio, não representa risco a estrutura e função dos músculos cardíaco e esquelético. Não houve também alterações significativas e indicativas de intoxicação provocada pela administração do EMPA no exame anatomopatológico.

Considerando-se tais resultados e levando-se em consideração que muitos destes processos patológicos se apresentam na forma de quadro crônico, estimulando o uso tradicional de plantas medicinais em regime de uso constante e duradouro, observa-se que a avaliação da toxicidade do *P. amapa* é de fundamental importância para a saúde pública, levando-se em conta que tal espécie é comumente usada por populações tradicionais como antiinflamatória, antiulcerogênica, antinociceptiva, entre outras atividades.

CONCLUSÃO

O uso das cascas do caule do *P. amapa* como fonte medicinal pode ser considerado aparentemente seguro, quando administrado por via oral. Para tal fim, fazem-se necessários estudos mais prolongados (toxicidade sub-crônica e crônica) para averiguar o desenvolvimento de prováveis danos nos sistemas fisiológicos decorrentes da administração crônica do *P. amapa*.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Breno Marques pela identificação do material vegetal, ao Programa de bolsas CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), ao Laboratório Central de Macapá, -LACEN-AP e a Universidade Federal do Amapá.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Berg, M. E. Van Den. 1982. *Plantas medicinais na Amazônia- Contribuição ao seu conhecimento sistemático*. CNPq/PRU/MPEG, Belém-PA, Brasil.
- Brasil, 2004. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. D. O. U. 18/03/04. *Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Carvalho, M.G.; Albuquerque, L.A.; Alves, C.C.F.; Cascon, V. 2008. Cornoside and other constituents from the latex of *Parahancornia amapa* (Hub.) Ducke (Apocynaceae) a medicinal plant in Northern Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18: 667-669.
- Carvalho, M.G.; Cranchi, D.C.; Kingston, D.G.I.; Werle, A.A. 2001. Acyl-lupeol Esteres from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae), *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12: 556-559.
- Cavalcante, M. F.; Oliveira, M. C. C.; Velandia, J. R.; Echevarria, A. 2001. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. *Química Nova*, 23: 120-136.
- Choi, L. S.; Simone, J.V. 1973. Platelet production in experimental iron deficiency anemia. *Blood*, 42: 219-218.
- Ferri, P.H. 1996. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, p.129-56.
- González, F.H.D.; Silva, S.C. 2003. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 1.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003, 270p.
- Henrique, M.C.; Nunomura, R.C.S.; Nunomura, S.M.; Silva, S.G. 2014. Constituintes químicos isolados dos galhos e cascas de amapazeiro (*Parahancornia amapa*, Apocynaceae). *Acta Amazonica*, 44: 533 – 538.
- Lopes, W.B. Moroni, F.T.; Brandenburgo, M.I.H.; Hamaguchi, A. 2002. *Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais*, Horizonte científico. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronical/b/desenvolvimento.pdf>. Acesso em: 18/12/2010.
- Lopes, B.P.M.; Mendonça, M.P.; Mallet, R.S.J.; Carvalho, G.M.; Queiroz, M. C.M. 2014. Bioactivity of the latex from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) on the development of *Rhodnius nasutus* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) under laboratory conditions. *Brazilian Journal of Entomology*, 58: 379–383.
- McLaughlin, J.L.; Rogers, L.L.; Anderson, J.E. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, 32: 513-24.
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E.; McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Revista Brasileira de Planta Medicinal*, 45: 31-34.
- Monteles, R.; Pinheiro, C.U.B. 2007. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 7: 38-48.
- Morais, P.B.; Martins, M.B.; Klaczko, L.B.; Hagler L.C.M.; Hagler A.N. 1995. Yeast Succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4251-4257.
- Ogston, D.; Dawson, A.A. 1969. Thrombocytosis following thrombocytopenia in man. *Postgrad. Medical Journal*, 45: 754-756.
- Parra, A.L.; Yhebra, R.S.; Sardiñas, I.G.; Buela, L.I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the stimulate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. *Phytomedicine*, 8: 395-400.
- Raza, M.; Al-Shabanah, A.O.; El-Hadiyah, T.M.; Al-Majed, A.A. 2002. Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70:135-145.
- Sobrinho, D.C.; Hauptli, M.B.; Appolinário, E.V.; Kollenz, C.L.M.; Carvalho, M.G.; Braz-Filho, R. 1991. Triterpenoids isolated from *Parahancornia amapa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2: 15-20.
- Teo, S.; Stirling, D.; Thomas, S.; Hoberman, A.; Kiorpes, A.; Khetani, V.A. 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of p-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 179: 183-196.

Tofovic, S. P.; Jackson, E. K. 1999. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journals of Cardiovascular Pharmacology*, 33: 360-366.

Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8: 303-313.

Recebido em 09/05/2015

Aceito em 07/07/2015