

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA AGUDA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae)

ACUTE TOXICOLOGICAL AND ANTI-INFLAMMATORY EVALUATION OF *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae)

DOI: <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v12.e1.a2024.pp3975-3987> Recebido em: 31.07.2023 | Aceito em: 18.04.2024

Waldileny Ribeiro de Araújo Moura^a, Jéssica Vanessa dos Santos Lindoso^a, Francilene Vieira da Silva^a, Cíntia Régis da Silva Reis^a, Carlos Mateus de Sousa Soares^a, Ana Emília Formiga Marques^b, Klinger Antônio da Franca Rodrigues^c, Ilmara Cecília Pinheiro da Silva Morais^a, Sílvia de Araújo França Baêta^a, Fernando Aécio de Amorim Carvalho^a, Maria José dos Santos Soares^a, Danielly Albuquerque da Costa^d, Rita de Cássia Meneses Oliveira^a, Rozeverter Moreno Fernandes^a, Daniel Dias Rufino Arcanjo^{a*}

^aUniversidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil

^bFaculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte - FMJ, Juazeiro do Norte - CE, Brasil

^cUniversidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr, Parnaíba - PI, Brasil

^dUniversidade Federal da Paraíba - UFPB, João Pessoa - PB, Brasil

*E-mail: daniel.arcanjo@ufpi.edu.br

RESUMO

Considerando a potencial aplicação do extrato etanólico (Ssan-EtOH) da *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) em estudos com ênfase no tratamento de doenças cardiovasculares, o presente artigo tem como objetivo avaliar o perfil toxicológico agudo *in vitro* e *in vivo* do Ssan-EtOH e também sua atividade anti-inflamatória. Nesse sentido, a toxicidade aguda foi avaliada *in vitro* por meio de citotoxicidade por MTT, *in vivo* em ratos Wistar machos tratados com Ssan-EtOH em doses orais, até no máximo 2000 mg/kg e a atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio de testes de edema. Observou-se para Ssan-EtOH CC₅₀ de 14,45 µg/mL indicando elevada citotoxicidade para macrófagos murinos. *In vivo* não foram observadas mortes ou alterações nos parâmetros clínicos e comportamentais avaliados. A curva de ganho de peso e parâmetros bioquímicos séricos, assim como as avaliações macroscópica e histopatológica dos órgãos não mostraram alterações quando comparados ao grupo controle. Assim, a presença de citotoxicidade celular e a ausência de toxicidade aguda *in vivo* observada para o Ssan-EtOH demonstram um aceitável perfil de segurança para estudos agudos em modelos animais visando investigar os potenciais farmacológicos, biotecnológicos e terapêuticos, mas com necessária cautela, evidenciando a necessidade de estudos relativos à toxicidade crônica. Quanto à avaliação anti-inflamatória, observou-se que Ssan-EtOH apresenta atividade anti-edematogênica evidenciada nos modelos de edema de orelha e de pata, possuindo princípios ativos responsáveis pela atividade anti-edematogênica, necessitando de estudos para avaliar os possíveis mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: *Sida santaremnensis*; Extrato etanólico; Toxicologia; Anti-inflamatório.

ABSTRACT

Considering the potential application of the ethanolic extract (Ssan-EtOH) of *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) in studies with an emphasis on the treatment of cardiovascular diseases, this article aims to evaluate the *in vitro* and *in vivo* acute toxicological profile of Ssan-EtOH and its anti-inflammatory activity. In this sense, the acute toxicity was evaluated *in vitro* through cytotoxicity by MTT, *in vivo* in male Wistar rats treated with Ssan-EtOH in oral doses, up to a maximum of 2000 mg/kg and the anti-inflammatory activity was evaluated through edema tests. It was observed for Ssan-EtOH CC₅₀ of 14.45 µg/mL indicating high cytotoxicity for murine macrophages. *In vivo*, no deaths or changes in clinical and behavioral parameters were observed. The weight gain curve and serum biochemical parameters, as well as the macroscopic and histopathological evaluations of the organs did not show alterations when compared to the control group. Thus, the presence of cellular cytotoxicity and the absence of acute toxicity *in vivo* observed for Ssan-EtOH demonstrate an acceptable safety profile for acute studies in animal models aiming to investigate the pharmacological, biotechnological and therapeutic potentials, but with necessary caution, evidencing the need for studies related to chronic toxicity. As for the anti-inflammatory evaluation, it was observed that Ssan-EtOH has anti-edematogenic activity evidenced in models of ear and paw edema, having active principles responsible for the anti-edematogenic activity, requiring studies to evaluate the possible mechanisms involved.

Keywords: *Sida santaremnensis*; Ethanolic extract; Toxicology; Anti-inflammatory.

INTRODUÇÃO

Estudos etnofarmacológicos relatam o uso de espécies do gênero *Sida* para uma infinidade de enfermidades, apresentando diversas atividades biológicas. Estudos realizados com *Sida santaremnensis* revelaram atividade antiulcerogênica (OLIVEIRA et al., 2008), antinociceptiva (MENDES et al., 2008) e antiedematogênica (MOURA, 2010). Além disso, pesquisas relatam como extrato etanólico (Ssan-EtOH), obtido a partir das partes aéreas da *Sida santaremnensis* H. Monteiro (malvaceae), apresenta atividade inibidora *in vitro* da ECA e promove vasodilatação mediada pelo aumento na produção de óxido (NO), além de ausência de citotoxicidade (ARCANJO et al., 2011), enfatizando o valor em se investigar seu potencial farmacológico, toxicológico, biotecnológico e terapêutico.

Estudos de toxicidade aguda em animais são comumente aplicados para atender a requisitos de classificação dos riscos para a saúde humana e para o ambiente. Uma estimativa pontual da dose letal em 50% dos animais de um experimento (DL₅₀), ou do intervalo de sua estimativa, geralmente atende aos requisitos de classificação para todas as autoridades reguladoras nas áreas de produtos químicos, farmacêuticos, produtos de consumo em geral e pesticidas. As informações obtidas nesses estudos são úteis para definir doses em estudos de dose-repetida, e identificar preliminarmente alguns possíveis órgãos alvo de toxicidade, além de fornecer informações relevantes para seleção de doses em estudos de Fase I ou overdose em humanos (CDER, 1996; OECD, 2002b). Desta forma, considerando as potenciais aplicações previamente demonstradas para o Ssan-EtOH, a avaliação de sua toxicidade aguda *in vitro* e *in vivo* e sua atividade anti-inflamatória foram realizadas neste estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do extrato etanólico da Sida santaremnensis (Ssan-EtOH)

A coleta do material botânico foi realizada no Parque da Cidade, em Teresina-PI, e a espécie identificada e depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí, sob exsicata n.º 21.867. O extrato etanólico bruto de *Sida santaremnensis* (Ssan-EtOH) foi preparado a partir das partes aéreas (caule, folhas e flores) conforme ARCANJO et al. (2011).

Animais

Ratos Wistar (200-250 g, 3 meses) e camundongos BALB/c (25-30 g, 2 meses), provenientes do Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, foram utilizados. Os animais foram mantidos durante todo o período de estudo em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (23 ± 2°C), com livre acesso a água e alimentação (Purina-Nestlé, São Paulo, SP, Brasil). Os procedimentos utilizados estavam de acordo com as normas internacionais preconizadas pela OECD, e realizados com aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil (permissão n° 008/2012).

Cultivo e retirada de macrófagos peritoneais murinos

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos Balb/c machos. Três dias após a administração intraperitoneal de 1,5 mL de tioglicolato a 3,0%, os animais foram eutanasiados e imersos em álcool 70% por 1 min para assepsia. Em fluxo laminar, adicionou-se 8,0 mL de PSS estéril na cavidade peritoneal. Após, a solução contendo macrófagos peritoneais foi aspirada e transferida para um tubo estéril em banho de gelo e submetida a duas centrifugações a 1500 rpm a 4 °C durante 10 min, com sucessivas lavagens com solução salina estéril (NaCl 0,9%). Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2,0 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10%, penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/ml. A contagem dos macrófagos viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, na presença do corante Azul de Tripán para análise de viabilidade celular (RODRIGUES et al., 2015).

Viabilidade celular de macrófagos pelo teste do MTT

A avaliação da atividade citotóxica do Ssan-EtOH em macrófagos murinos Balb/c foi realizada pelo ensaio do MTT. Em placas de 96 poços, macrófagos (1×10⁶/poço) foram incubados com 100 µl de meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA) a 37 °C em CO₂ 5% durante 4 horas, para aderência celular. Em seguida, Ssan-EtOH foi incubado em diferentes concentrações (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml) durante 48 h a 37 °C e CO₂ 5%. Posteriormente, adicionou-se 10 µl of MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) a partir de uma solução estoque a 5 mg/mL em PBS, e incubou-se por

4 h a 37 °C e 5% CO₂. Logo após, o sobrenadante foi descartado e 100 µl de DMSO foi adicionado em cada poço. A placa foi mantida em agitação por 30 min para completa dissolução do formazan. As absorbâncias foram lidas em 550 nm (Absorbance microplate reader ELx800™, BioTek® Instruments, USA). Os resultados foram expressos em CC₅₀ (concentração citotóxica média para 50% das células) com intervalo de confiança calculados por regressão não-linear (RODRIGUES et al., 2013, 2015).

Avaliação da toxicidade aguda in vivo

A avaliação toxicológica do SSan-EtOH foi realizada através da DL₅₀. Ratos Wistar foram divididos em 02 grupos com 03 animais cada, sendo um controle tratado com solução salina por via oral (0,1 mL/10 g de peso corporal), e os outros 02 grupos tratados por via oral com Ssan-EtOH na dose de 2000 mg/kg. Após a primeira semana de observações, de acordo com a presença ou ausência de mortalidade, os tratamentos foram repetidos em outros 02 grupos de 03 animais cada, totalizando 6 animais por tratamento.

Avaliação de parâmetros clínicos e comportamentais

Após administração do Ssan-EtOH, os animais foram monitorados nas primeiras 8 h, para observação da ocorrência de morte. Após 24 h, o tempo de observação para cada grupo foi de 30 minutos a 1 h. Os animais foram pesados diariamente e os parâmetros clínicos e comportamentais foram avaliados conforme o Guia de Reconhecimento, Avaliação e Uso de Sinais Clínicos da OECD (OECD, 2002c). Os principais parâmetros avaliados estão listados na Tabela S1.

Análise dos parâmetros bioquímicos

Após o 14.º dia de observação, os animais foram anestesiados com tiopental sódico 45 mg/kg e amostras de sangue foram coletadas dos animais pelo plexo orbital com auxílio de um tubo capilar de vidro e tubos para coleta com ativador de coagulação e gel separador (Vacuette, Greiner Bio-One, Alemanha). O material foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, determinados os parâmetros glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol VLDL, colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), ácido úrico, bilirrubina direta, bilirrubina total, albumina, potássio,

sódio e proteínas totais. Os ensaios foram realizados em aparelho automático LABTEST® Pleno utilizando kits comerciais do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Avaliação de peso corporal e peso dos órgãos dos animais

Os animais foram pesados todos os dias do tratamento para elaboração de uma curva de ganho de peso. No décimo quarto dia os animais foram anestesiados, e posteriormente eutanasiados com dose letal de tiopental sódico (150 mg/kg) e lidocaína (10 mg/kg), via intraperitoneal. Em seguida, coração, pulmão, fígado, baço e rins foram retirados, pesados e submetidos à avaliação macroscópica de órgãos internos quanto à cor, textura e consistência. Em seguida, os órgãos foram pesados a fim de obter o seu peso relativo através da fórmula: peso do órgão (g) / peso do animal no dia da necropsia (g) × 100.

Análise histopatológica

Após a realização da eutanásia, foi realizada a coleta dos órgãos (pulmão, coração, fígado e rim) e preparados para avaliação histopatológica, por meio de fixação em solução tamponada de formalina a 10% por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram clivadas em fragmentos de 0,5 cm de espessura e estes submetidos a processamento histológico que inclui desidratação tissular em soluções de álcool etílico com concentrações crescentes, 70%, 80%, 90%, e 100%, imediata diafanização em xilol, embebição por parafina líquida e inclusão em parafina. Após o resfriamento e solidificação do bloco de parafina, este foi desenhado e realizada a microtomia, fazendo-se cortes seriados, de 4 a 5 µm, que foram colocados em lâminas histológicas de vidro. As secções histológicas foram coradas pela técnica rotineira de HE (hematoxilina e eosina) (LUNA, 1968). Em seguida, os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz para verificação de alterações histopatológicas e diagnóstico morfológico destas.

Avaliação da atividade anti-inflamatória

Edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos

Seguindo-se o método de Schiantarelli et al. (1982), grupos de 5-10 camundongos (machos e fêmeas) foram anestesiados com tiopental sódico (25 mg/kg) para

a aplicação tópica do óleo de cróton (10 μ L, 0,05 %) na orelha direita, após uma hora do tratamento aplicou-se topicamente dexametasona (0,2 mL/orelha), veículo (salina, NaCl 0,9 %) ou extratos Cl-EtOH ou Ssan-EtOH (0,05 a 5 mL/orelha). A orelha esquerda recebeu apenas acetona. Após quatro horas da aplicação do óleo de cróton, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e suas orelhas cortadas com perfurador (6 mm de diâmetro) para medida do edema (mg). Calculou-se a porcentagem de inibição do edema, comparando-se o aumento percentual médio do peso da orelha do grupo controle, com aquele do grupo tratado.

Edema de pata induzido por carragenina em ratos

Grupos de 5-8 ratos (machos e fêmeas) foram tratados por via oral com veículo, extrato (Ssan-EtOH: doses 50mg/kg ou 200mg/kg; Cl-EtOH: doses 250mg/kg ou 500mg/kg) ou indometacina (5 mg/kg), v.o.. Após uma hora ocorreu a aplicação de carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.). O edema da pata foi medido a cada 60 minutos por um paquímetro digital durante 6 horas após indução da inflamação. A diferença do volume da pata no tempo final (Vf) e tempo zero (Vi) foram determinados para cada animal.

Edema de pata induzida por dextrana

Grupos de 5-8 camundongos (machos e fêmeas) foram tratados via oral com veículo (solução salina 0,9%), extrato ou ciproheptadina (10mg/kg). Após 1 hora ocorreu injeção de dextrana (100 μ g/pata). O volume em mL da pata foi medido usando o método descrito por Winter et

al., (1962) com adaptações. O edema da pata foi medido após 1 hora de administração da dextrana, seguindo método descrito por Winter et al com adaptações (1962). Os animais foram eutanasiados com superdose de tiopental sódico, as patas foram retiradas e pesadas. A inibição do edema foi calculado pela diferença do peso (mg) da pata que recebeu o estímulo com a pata contra lateral e os valores expressos em mg.

Análise Estatística

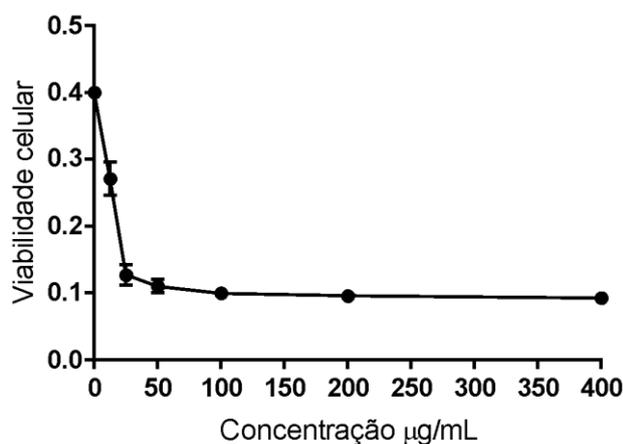
Os dados obtidos foram expressos como média \pm e.p.m. e analisados por ANOVA, seguida de pós-teste de Tukey nas análises anti-inflamatórias. Já para os dados referentes a análise toxicológica, as diferenças entre os grupos foram determinadas através de teste *t* de Student para amostras não pareadas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS

Atividade toxicológica

Encontrou-se neste estudo, ao realizar o teste de viabilidade celular em macrófagos para Ssan-EtOH, uma CC_{50} de 14,45 μ g/mL com intervalos de confiança 95% de 4,14 – 26,65, indicando atividade citotóxica (Figura 1). Já em relação aos testes realizados *in vivo* com ratos Wistar, nenhuma morte, bem como nenhuma alteração comportamental ou sinal clínico foram observados após administração aguda de 2000 mg/kg, via oral.

Figura 1. Viabilidade celular pelo método MTT em macrófagos murinos.



Durante as primeiras 24h da administração oral de Ssan-EtOH (2000 mg/kg) e ao longo dos 14 dias, nenhum animal apresentou sinais característicos de toxicidade como: cianose, piloereção, contorções, ptose palpebral, tremores, convulsões, ataxia ou diarreia. Também não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados para os parâmetros de atividade motora, frequência respiratória e reflexos corneal e auricular. Dessa forma, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. A atividade geral dos animais não foi alterada, apresentando um bom estado geral (Tabela S1).

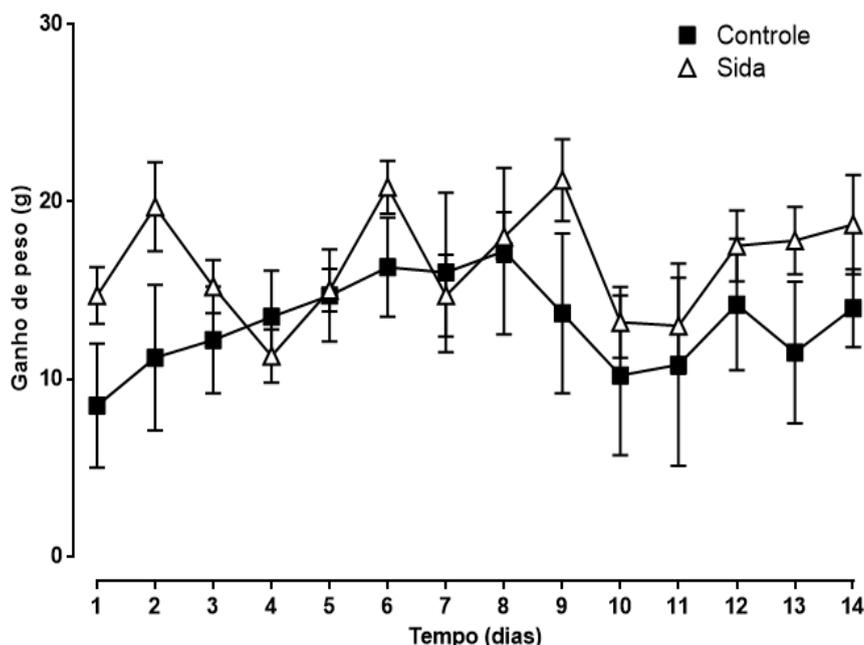
Em relação ao ganho de peso, foi possível

observar que o tratamento com Ssan-EtOH não alterou, de forma significativa, o ganho de massa corporal dos camundongos durante todo o período do tratamento (Figura 2). É possível afirmar também, que a administração aguda de Ssan-EtOH por via oral promoveu alterações no perfil bioquímico dos ratos tratados em comparação com os do grupo controle, em valores referentes aos níveis lipídicos (triglicerídeos e colesterol VLDL) e fosfatase alcalina (ALP), que apresentaram redução significativa quando comparados ao grupo controle e glicose que apresentou aumento em relação ao controle (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação de parâmetros bioquímicos séricos de ratos Wistar fêmeas tratadas com Ssan-EtOH por via oral. Os valores representam a média \pm E.P.M (n=6/grupo). *p<0,05; ** p<0,01 versus controle; Teste t de Student para amostras não pareadas.

Parâmetros	Controle	Ssan-EtOH 2000 mg/kg
Glicose (mg/dL)	121,67 \pm 3,29	135,83 \pm 4,78*
Uréia (mg/dL)	39,52 \pm 1,11	36,27 \pm 1,86
Creatinina (mg/dL)	0,33 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01
AST (U/mL)	123,62 \pm 10,59	108,18 \pm 11,84
ALT (U/mL)	64,08 \pm 6,18	70,40 \pm 2,80
ALP (U/mL)	164,07 \pm 25,52	102,98 \pm 9,88*
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,04 \pm 0,0	0,04 \pm 0,01
Bilirrubina total (mg/dL)	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Albumina (mg/dL)	4,2 \pm 0,15	4,12 \pm 0,11
Proteínas totais (mg/dL)	6,14 \pm 0,14	6,19 \pm 0,10
Colesterol total (mg/dL)	73,86 \pm 7,58	71,38 \pm 5,7
Colesterol VLDL (mg/dL)	15,32 \pm 0,60	9,88 \pm 1,07**
Triacilgliceróis (mg/dL)	76,50 \pm 3,04	49,50 \pm 5,30**
Ácido úrico (mg/dL)	0,82 \pm 0,08	0,97 \pm 0,13
Sódio (mmol/L)	146,23 \pm 0,63	145,03 \pm 0,46
Potássio (mmol/L)	4.300 \pm 0,10	4.280 \pm 0,12

Figura 2. Evolução do ganho de peso dos animais dos grupos controle (■) e tratados com Ssan-EtOH (via oral) na dose 2.000 mg/kg. Dados representados por média ± erro-padrão, n=6 animais/grupo



Quanto ao peso relativo dos órgãos, parâmetro avaliativo de toxicidade geral, não foi observada nenhuma alteração entre o grupo tratado e o controle (Tabela 2), bem como nenhuma alteração macroscópica entre eles.

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos após 14 dias do tratamento oral com dose única de Ssan-EtOH (2000 mg/kg).

Órgãos (g)	Controle	Ssan-EtOH 2000 mg/kg
Pulmões	0,708 ± 0,032	0,918 ± 0,050
Coração	0,324 ± 0,012	0,373 ± 0,020
Fígado	2,881 ± 0,153	2,970 ± 0,120
Baço	0,355 ± 0,021	0,369 ± 0,020
Rins	0,669 ± 0,027	0,702 ± 0,020

Foi realizado também estudo detalhado de seções histológicas representativas do fígado, rim, pulmão e coração oriundos de ratas Wistar tratadas por via oral na dose única de 2000 mg/kg de Ssan-EtOH expostos na Tabela 3 e Figuras 3 e 4. Observou-se que em 83,3% dos fragmentos de pulmão do grupo tratado encontrou-se pneumonia intersticial discreta a moderada e no grupo controle 66,66% dos animais também apresentaram pneumonia intersticial discreta.

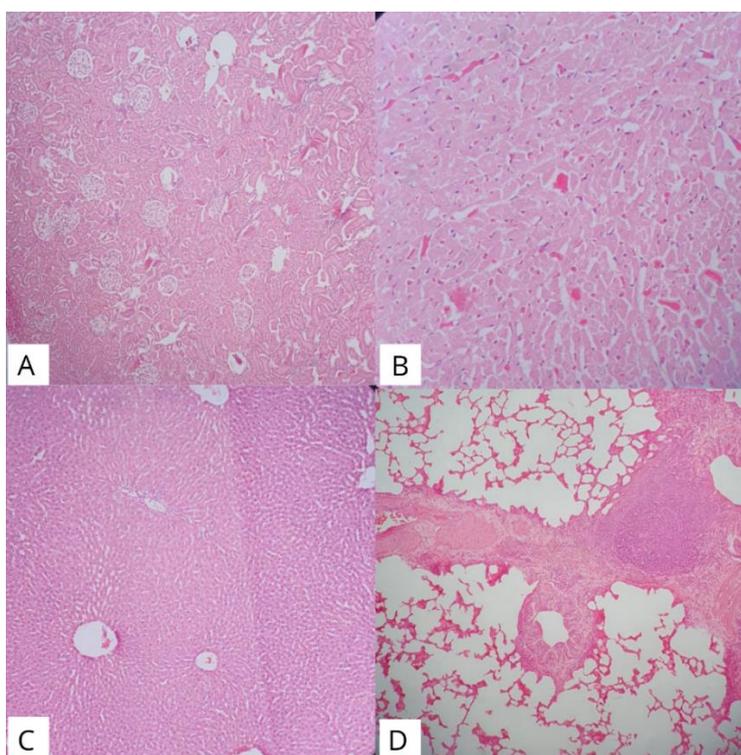
As alterações hepáticas mais comuns foram

hiperemia difusa aguda, também notada nos dois grupos e sem correlação com toxicidade e degeneração vacuolar focal discreta em 33,3% dos animais do grupo controle. Com relação aos achados renais, 50% dos animais tratados apresentaram nefrose tubular e 33,3% apresentaram glomerulonefrite proliferativa, destacando-se que não houve alteração nos valores bioquímicos de função renal. Apenas 16,6% dos animais do grupo tratado apresentaram achados cardíacos como degeneração granular aguda.

Tabela 3. Análise qualitativa de achados histopatológicos: (%) de ratas tratadas com dose única de SSan-EtOH. (D = discreto).

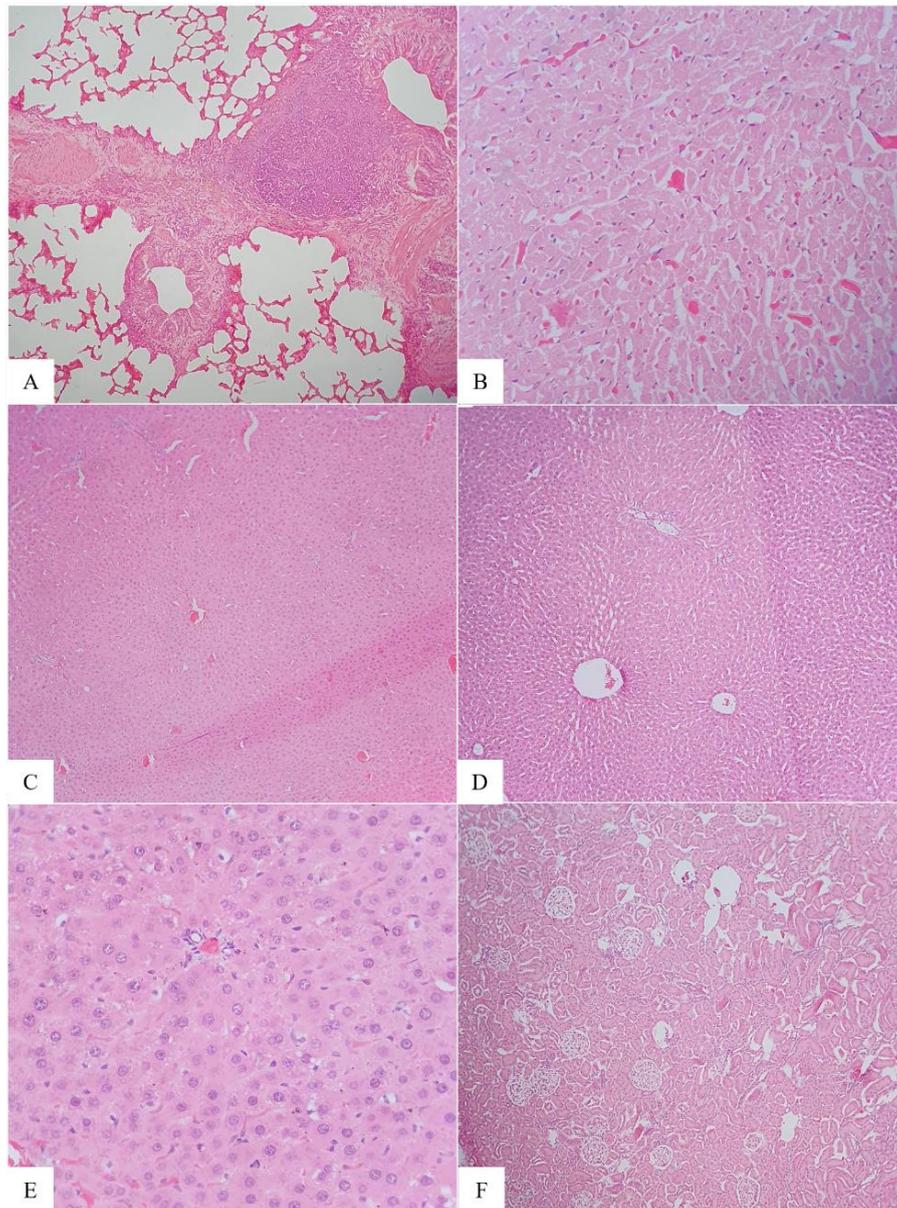
Achados hepáticos (%)	Controle	Ssan-EtOH 2000 mg/kg
<i>Normal</i>	33,3	16,6
<i>Hiperemia difusa aguda</i>	33,3 D	66,6 D
<i>Degeneração vacuolar focal aguda</i>	33,3 D	0
<i>Hiperemia centrolobular aguda</i>	0	16,6
Achados renais (%)	Controle	Ssan-EtOH 2000 mg/kg
<i>Normal</i>	50	0
<i>Hiperemia difusa aguda</i>	50 D	16,6 D
<i>Nefrose Tubular</i>	0	50
<i>Glomerulonefrite proliferative</i>	0	33,3
Achados pulmonares (%)	Controle	Ssan-EtOH 2000 mg/kg
<i>Normal</i>	0	0
<i>Hiperemia difusa aguda</i>	83,3	83,3
<i>Pneumonia intersticial linfocítica aguda</i>	66,6	83,3
<i>Hiperplasia de Balt</i>	33,3	50
<i>Células Espumosas</i>	16,6	0
<i>Hiperplasia de tecidos linfóides</i>	0	16,6
Achados cardíacos (%)	Controle	Ssan-EtOH 2000 mg/kg
<i>Normal</i>	83,3	33,3
<i>Hiperemia difusa aguda</i>	16,6	50
<i>Degeneração granular aguda</i>	0	16,6

Figura 3. Fotomicrografias de secções histológicas obtidas do rim (A), coração (B), fígado (C) e pulmão (D) dos animais (n=6) dos grupos controle.



Legenda: A – Rim. Objetiva de 20x; B – Coração. Objetiva de 20x; C – Fígado. Objetiva de 20x; D – Pulmão. Objetiva de 40x.

Figura 4. Fotomicrografia representativa de tecido hepático, renal, pulmonar e cardíaco de ratas Wistar tratadas com Ssan-EtOH dose única, 2000 mg/kg.



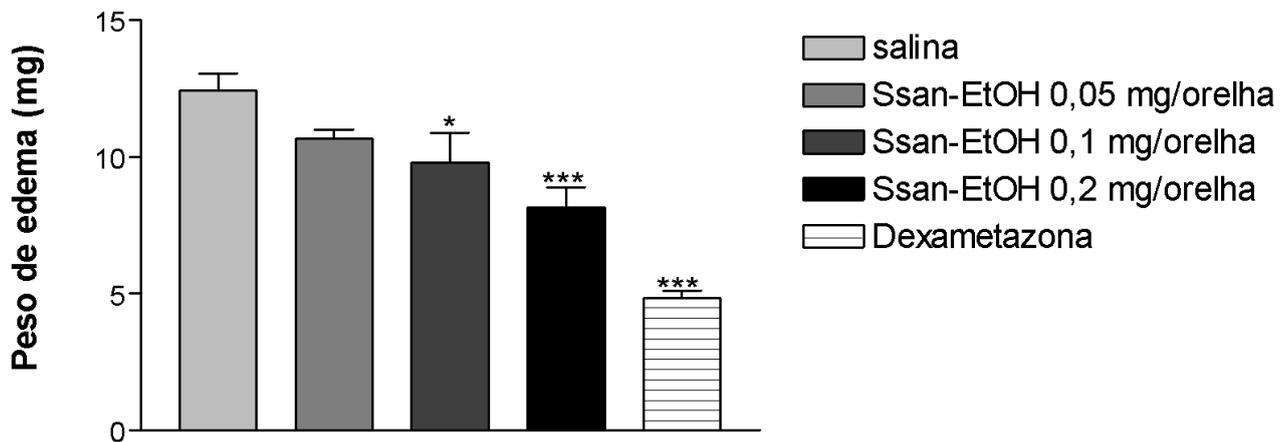
Legenda: A – Pulmão. Objetiva de 20x; B – Coração. Objetiva de 20x; C – Fígado. Objetiva de 10x; D – Fígado. Objetiva de 20x; E – Fígado. Objetiva 40x; F – Rim. Objetiva 20x.

Atividade anti-inflamatória

Na avaliação do edema de orelha induzido por óleo de cróton, um agente irritante que induz a síntese e liberação de histamina, serotonina, Ssan-EtOH na dose de

0,05 mg/orelha não demonstrou efeito anti-edematogênico significativo, quando comparado ao grupo controle (salina), mas nas doses de 0,1 e 0,2 mg/orelha observou-se efeito anti-edematogênico significativo quando comparado com o grupo controle (Figura 5).

Figura 5. Efeito do extrato Ssan-EtOH sobre o edema de orelha induzido por aplicação tópica do óleo de cróton (10 μ L, 0,05 %), 1 h após tratamento tópico com dexametasona (0,2 mg/orelha) e veículo em camundongo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$; ANOVA one-way seguida do teste de Tukey.



Também se avaliou o efeito do Ssan-EtOH administrado por via oral, sobre a resposta inflamatória induzida por carragenina (1% subplantar), no modelo de edema de pata em ratos. Os resultados obtidos demonstram que Ssan-EtOH na dose de 50 mg/kg teve

efeitos significativos até a quinta hora, quando comparados ao controle (Figura 6). Já no modelo de edema de pata induzida por dextrana não foi observado redução significativa do edema pelo extrato Ssan-EtOH (50mg/kg e 200mg/kg) (Figura 7).

Figura 6. Efeito do extrato Ssan- EtOH sobre o edema de pata induzido por carragenina (100 μ L, 1%) em ratos Wistar adultos. Os animais foram tratados v.o. 60 min antes do estímulo. *** $p < 0,001$; ANOVA one-way seguida do teste de Tukey.

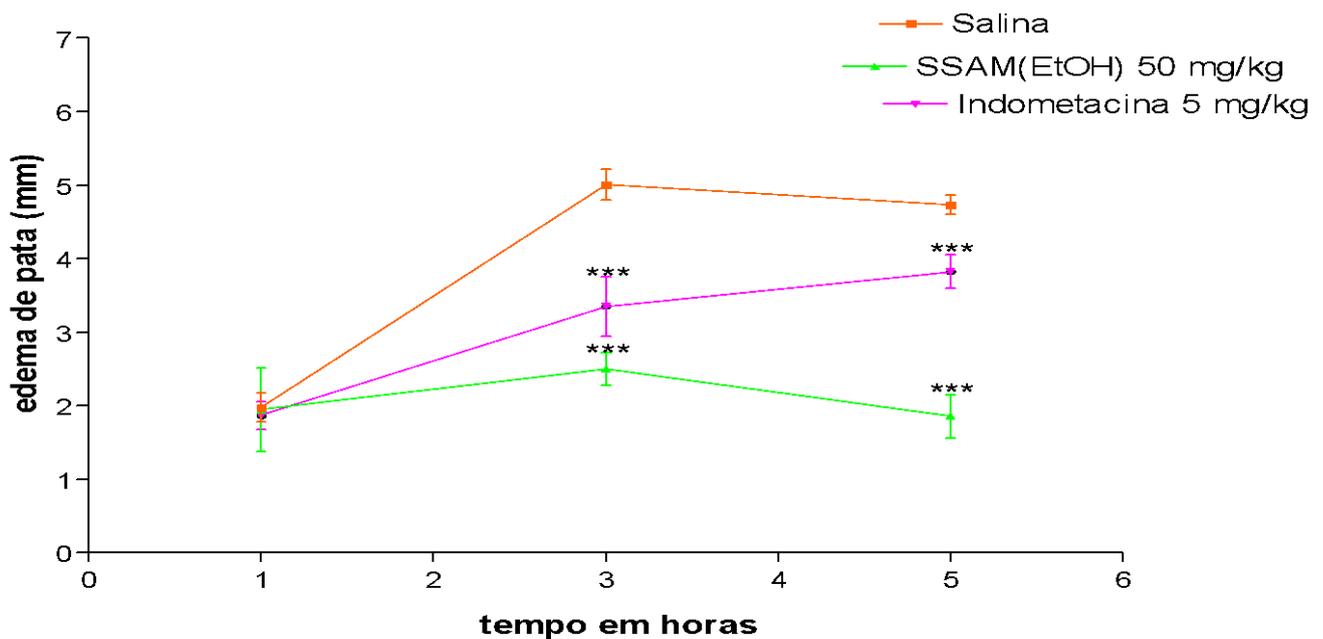
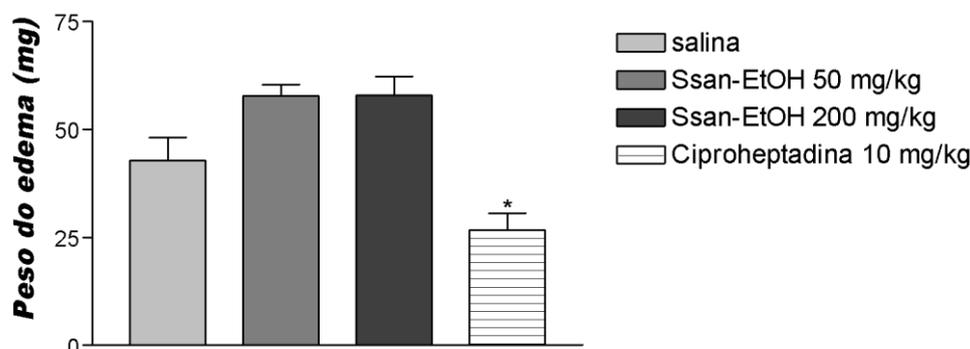


Figura 7. Efeito do extrato Ssan-EtOH e ciproheptadina (10mg/kg) sobre o edema de pata induzido por dextrana (100 µg/pata) em camungongos adultos. * $p < 0,05$; ANOVA one-way seguida do teste de Tukey.



DISCUSSÃO

O ensaio do MTT é um teste colorimétrico clássico de viabilidade celular largamente utilizado. Este teste é adequado para avaliar a função mitocondrial celular através da redução enzimática do sal tetrazólio pelas desidrogenases mitocondriais em células viáveis, levando a formação do formazan, um sal insolúvel de coloração arroxeada (MOSMANN, 1983). Encontrou-se neste estudo para o Ssan-EtOH toxicidade alta. Em estudos realizados por Alves (2014) avaliou-se a viabilidade das larvas de *Artemia salina* em função da concentração do extrato etanólico bruto (0 a 1000 µg/mL) de *Sida santaremnensis* e foi encontrada CL_{50} com o valor de 24,44 µg/mL com intervalo de confiança entre 20,00 a 28,88 µg/mL considerada elevada toxicidade, resultados similares a esta pesquisa.

De acordo com Nguta et al (2011) amostras com valores de CL_{50} inferiores 100 µg/mL são considerados altamente tóxicas, valores entre 100 e 500 µg/mL são moderadamente tóxicas, entre 500 e 1000 µg/mL são suavemente tóxicas e acima de 1000 µg/mL são atóxicas. Além disso, outros pesquisadores avaliaram a citotoxicidade do gênero *Sida* investigando a viabilidade de *Artemia salina* com relação ao extrato bruto da espécie *Sida planicaulis* (MARQUES et al, 2020) com resultados de CL_{50} de 234,22 µg/mL e *Sida tuberculata* (DA ROSA et al, 2016), com resultados > 1000 µg/mL para folhas e raízes, demonstrando que essas espécies possuem toxicidades menores do que a *Sida santaremnensis*.

O princípio do Teste de Classe Tóxica Aguda consiste em um uso mínimo de animais por etapa (3 animais), geralmente fêmeas. A ausência ou presença de morte determinará se o estudo continuará com a mesma dose ou com dose inferior em outros 3 animais. O número

de mortes observadas por grupo e tratamento classifica o produto em uma escala GHS (Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado) de 1 a 5, referente a uma estimativa da DL_{50} (OECD, 2002a). O Ssan-EtOH na dose de 2000 mg/kg, administradas por via oral em ratos Wistar, não provocou morte dos animais, dentro de 240 minutos a 72 horas e até 14 dias após a observação, indicando ausência de toxicidade para as doses e esquema de administração avaliados. Dessa forma, não foi possível determinar a DL_{50} para o Ssan-EtOH, sendo classificado na Categoria 5 do GHS.

A administração aguda do Ssan-EtOH (2000 mg/kg) por via oral em ratos não induziu modificações significativas no perfil bioquímico, em comparação com o grupo controle. Os ratos apresentaram todos os parâmetros dentro da faixa de referência observada para vários biotérios padronizados (SANTOS et al, 2010), exceto os valores referentes aos níveis lipídicos, que apresentaram redução significativa quando comparados ao grupo controle. Estes dados sugerem estudos adicionais referentes à avaliação do efeito hipolipemiante induzido pelo Ssan-EtOH em modelos experimentais de diabetes, reforçando assim seu potencial aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares (ARCANJO et al, 2011).

Nesta pesquisa nenhuma alteração foi encontrada no peso dos órgãos e a análise macroscópica dos órgãos (pulmão, coração, fígado, baço, rins) dos animais não detectou alterações relevantes em nenhum dos grupos tratados. Na análise histológica, os achados hepáticos mais encontrados foram hiperemia difusa aguda, também notada nos dois grupos e sem correlação com toxicidade. A hiperemia aguda difusa observada nos órgãos analisados, pode ser sido causada pelo estresse e eutanásia. Observou-se também degeneração vacuolar focal discreta em 33,3% dos animais do grupo controle, provavelmente

ocasionados devido jejum prolongado em animais de bom escore corporal. Já nos achados renais, metade dos animais tratados apresentaram nefrose tubular e 33,3% glomerulonefrite proliferativa, apesar de que não houve alteração nos valores bioquímicos de função renal.

A nefrose é um processo degenerativo e necrótico que se caracteriza morfológicamente pela destruição das células epiteliais tubulares. Geralmente é resultante de uma injúria tóxica que pode ser endógena ou exógena, ou isquêmica ao rim (SANTOS et al, 2003). Já a glomerulonefrite não tem associação a processos tóxicos, podendo ser de origem autoimune, infecciosa (viral, bacteriana, parasitária) (GRAUER, 2001).

Com relação as alterações cardíacas, apenas 16,6% dos animais do grupo tratado apresentaram degeneração granular aguda, um processo degenerativo dos cardiomiócitos, pode ser reversível e causado por agentes infecciosos e tóxicos. Pode ser uma alteração frequente associada a substâncias cardiotoxícas. Destaca-se que outras espécies do gênero *Sida* demonstraram toxicidade, mesmo baixa, como a *Sida tuberculata* (DA ROSA et al, 2016). Já a *Sida carpiniifolia* tem sido alvo de estudo em pequenos ruminantes, devido a potencial toxicidade do composto swainsonina ingerido a longo prazo, podendo levar a patologia de acúmulo lisossomal, sugerindo que estudos de toxicidade crônica possam ser interessantes para maiores esclarecimentos sobre a toxicidade deste gênero (DRIEMEIER et al, 2000; COLODEL et al, 2002).

Ao analisar o potencial anti-inflamatório de Ssan-EtOH, foi possível observar atividade antiedematogênica. O edema é um mecanismo de defesa local exclusiva dos tecidos mesenquimais lesados; a evolução do edema passa por várias etapas, entre elas, estão os fenômenos básicos do agente inflamatório que envolve a mediação química de fármacos e que poderá ocorrer em qualquer inflamação sendo ela aguda ou crônica (TUBARO et al., 1985). O edema de orelha induzido por óleo de cróton representa um modelo muito usado para estudar a atividade anti-inflamatória de drogas esteroidais e não esteroidais (TUBARO et al., 1985), assim como o edema de pata por

carragenina.

Na avaliação do edema de orelha induzido por óleo de cróton, um agente irritante que induz a síntese e liberação de histamina, serotonina, Ssan-EtOH nas doses de 0,1 e 0,2 mg/orelha demonstrou efeito anti-edematogênico significativo quando comparado com o grupo controle, sugerindo assim que os princípios ativos presentes no extrato (Ssan-EtOH) interferiram com a liberação ou a própria ação de vários mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, bradicinina, PAF, substância P, dentre outras (LAPA, 2003).

Além disso, Ssan-EtOH também demonstrou atividade frente ao edema induzido por carragenina. Qualquer substância que iniba a ação da carragenina no modelo utilizado é considerada como tendo ação anti-inflamatória. Os resultados obtidos demonstram que este extrato pode conter princípios ativos que inibam o processo inflamatório em diferentes etapas da resposta inflamatória em que estariam envolvidos vários mediadores químicos da inflamação (histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas).

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados permitem concluir que apesar de observar-se uma elevada citotoxicidade em macrófagos, Ssan-EtOH apresentou atividade anti-inflamatória e antiedematogênica, além de não apresentar sinais de toxicidade aguda após administração em dose única elevada no modelo avaliado. Dessa forma, isso demonstra um aceitável perfil de segurança para estudos agudos em modelos animais visando investigar os potenciais farmacológicos, biotecnológicos e terapêuticos para este extrato e uma necessidade de estudos relativos à toxicidade crônica *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à UFPI, CNPq, CAPES e FAPEPI pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

ALVES, Jair Dantas. Investigação da toxicidade de *Sida santaremnensis* através do bioensaio com *Artemia salina* leach. 2014. 51 fl. (Trabalho de Conclusão de Curso – Monografia), Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – Paraíba – Brasil, 2014. [Internet]. Available from:

<<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/9588>>. Acesso em: 6 dez 2022.

ARAÚJO, G. L. et al. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 1, p. 55–62, mar.

2014.
82502011000100005

<https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>

ARCANJO, Daniel Dias Rufino et al. Vasorelaxant response induced by *Sida santaremnensis* H. Monteiro ethanol extract on rat superior mesenteric artery. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 65, p. 14587-14597, 2011. DOI: 10.5897/AJB11.1429.

CDER. **Guidance for Industry: Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/72288/download>>. Acesso em: 6 dez. 2022.

COLODEL, EDSON M. et al. Aspectos clínicos e patológicos da intoxicação por *Sida carpinifolia* (Malvaceae) em caprinos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 51-57, abr. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2002000200004>

DA ROSA, H.S. et al. *Sida tuberculata* (Malvaceae): a study based on development of extractive system and in silico and in vitro properties. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 49, n. 8, e5282, 2016. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165282>

DRIEMEIER, D., et al. Lysosomal Storage Disease Caused by *Sida Carpinifolia* Poisoning in Goats. **Veterinary Pathology**, vol. 37, no. 2, p. 153–159, Mar. 2000. DOI: 10.1354/vp.37-2-153

GRAUER, G.F. Insuficiência Renal. In: NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDAMN, M.T.R.L.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T.C.M., 2003. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. p. 104,105 e 112.

LUNA, L. G. Routine Staining Procedures. In: LUNA, L. G. (eds). **Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw- Hill Book Co, cap. 4, p. 32-46, 1968.

MARQUES, G.F, et al. Avaliação de extratos de *Sida planicaulis* Cav. por meio do bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Educ. Ci. E Saúde**, v. 7, n. 1, p. 132-144, jan./jun., 2020. <http://dx.doi.org/10.20438/ecs.v7i1.256>

MENDES, R. M. B.; FIGUEIREDO, K. A.; LOPES, L. S.; PEREIRA, S. S.; OLIVEIRA, A. P.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F.R. C. Estudo do efeito antinociceptivo de *Sida santaremnensis* (Malvaceae). In: 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, Águas de Lindóia, SP. **Anais eletrônicos**, Disponível em < http://asp.spfte.org.br/pub/media/setor_07_2008.pdf> Acesso em: 28 de jan. 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, dez. 1983. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MOURA, W. R. A. **Ensaio Farmacológico das atividades anti-inflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda de *Copaifera Lueltzelburgai*, Harm e *Sida santaremnensis* Monteiro**, Tese (Doutorado), Universidade Federal do Piauí, 69 f, 2010.

NGUTA, Joseph Mwanzia et al. Biological screening of medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 2, n. 1, p. 458-78, ago. 2011.

OECD. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. In: **OECD Series on Testing and Assessment**. Paris: OECD Publishing, 2010. P. 1–54.

OECD. Guidance Document onto an Acute Oral Toxicity Testing. In: **OECD Series on Testing and Assessment**. OECD Series on Testing and Assessment. Paris: OECD Publishing, 2002b. p. 24

OECD. Test No. 423: **Acute Oral toxicity — Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD Publishing, 2002a^a

OLIVEIRA, E. T.; BRITO, C. A.; OLIVEIRA, M. R. C.; CHAVES, M. H.; OLIVEIRA, F. A. Atividade antiedematogênica de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (Malvaceae) em modelos animais. In: 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, águas de Lindóia, SP. **Anais eletrônicos**. Disponível em Acesso em 11 de fev. 2014.

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evidence-based complementary and**

alternative medicine: eCAM, v. 2013, p. 279726, jan. 2013. DOI: 10.1155/2013/279726

RODRIGUES, K. A. F. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, n. 2, p. 32–40, fev. 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2014.11.024

SANTOS, M. R. V. et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, 30 nov. 2010.

SANTOS, O.F.P. et al. Insuficiência Renal Aguda. In: RIELLA, M.C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólítico**. 4 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2003.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R. 1985. The crotonoil ear test revisited. **Agents Action..** 17:3/4, p.347-349.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. 1963. Anti-inflammatory and antipyretic activities of indometacina. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 141, p 369-76.