

ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS APÓS ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Rubus fruticosus* EM MODELO ANIMAL

RUPPENTHAL, S.B.¹; NOETZOLD M.V.¹; BATASSINI, C.¹; GIACOMELLI, S.R.¹;
LINARES, C.E.B.¹

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSOES¹

RESUMO

Introdução: Embora muitos usos tradicionais estejam registrados na literatura, escassos são os estudos quanto aos efeitos tóxicos da espécie *Rubus fruticosus* L., pertencente à família *Rosaceae*. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do extrato obtido das folhas de *R. fruticosus* sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos após ensaio da toxicidade aguda em ratos fêmeas da linhagem *Wistar*. **Metodologia:** Foi realizada a coleta das folhas da planta em Frederico Westphalen. Posteriormente, foi submetida aos processos de secagem, trituração e maceração com solvente metanólico. Os extratos obtidos foram filtrados, rotaevaporados e liofilizados, resultando o extrato bruto, o qual foi redissolvido em NaCl 9 % e tween 5 % (veículo). Os animais foram separados em grupo controle (n=3) e grupo *R. fruticosus* (n=6), onde este último grupo recebeu uma dose única de 2000 mg/Kg do extrato da planta, via oral, e o grupo controle somente veículo. Após, os animais foram eutanasiados e realizou-se a coleta sanguínea por punção cardíaca para as análises hematológicas e bioquímicas. **Resultados e Discussão:** Não foi observado alteração no consumo de água e ração dos animais e não foi registrado óbito. Dessa forma, o extrato foi classificado como classe 5 de toxicidade, conforme OECD (2001). Os resultados hematológicos e bioquímicos demonstraram um aumento significativo ($p < 0,01$) no grupo *R. fruticosus*, tanto para plaquetas quanto para glicemia quando comparado ao grupo controle. **Conclusões:** Dessa forma, apesar da espécie ser classificada na categoria 5 da OECD quanto a toxicidade, observa-se que os níveis de glicose e plaquetas aumentam frente a exposição a *R. fruticosus* na concentração testada.

Palavras-chave – *Rubus fruticosus*; *Rosaceae*; toxicidade aguda; amora-silvestre.

ABSTRACT

Introduction: Although many traditional uses are recorded in the literature, there are few studies on the toxic effects of the species *Rubus fruticosus* L., belonging to the *Rosaceae* family. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of the extract obtained from the leaves of *R. fruticosus* on biochemical and hematological parameters after an acute toxicity test in female *Wistar* rats. **Methodology:** The leaves of the plant were collected in Frederico Westphalen. Subsequently, it was subjected to the drying, crushing and maceration processes with methanolic solvent. The extracts obtained were filtered, rotated and lyophilized,

resulting in the crude extract, which was redissolved in NaCl 9 % and tween 5 % (vehicle). The animals were separated into a control group (n=3) and *R. fruticosus* group (n=6), where the latter group received a single dose of 2000 mg / kg of the plant extract, orally, and the control group only vehicle. Afterwards, the animals were euthanized and blood collection was performed by cardiac puncture for hematological and biochemical analyzes. **Results and Discussion:** There was no change in the consumption of water and animal feed and no death was recorded. Thus, the extract was classified as toxicity class 5, according to OECD (2001). The hematological and biochemical results showed a significant increase ($p < 0.01$) in the *R. fruticosus* group, both for platelets and for blood glucose when compared to the control group. **Conclusions:** Thus, despite the species being classified in category 5 of the OECD in terms of toxicity, glucose levels and increased plaques are observed when exposed to *R. fruticosus* in the tested concentration.

Keywords - *Rubus fruticosus*; Rosaceae; acute toxicity; BlackBerry.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, devido aos seus efeitos terapêuticos confiáveis e acessibilidade à população, os produtos naturais tiveram crescimento no uso popular. Com isso, cada vez mais faz-se necessário estudos de atividades biológicas e toxicológicas, afim de garantir a segurança e eficácia dos mesmos (RAO *et al*, 2019).

Neste contexto, encontra-se a espécie *Rubus fruticosus* L., pertencente à família Rosaceae. Esta espécie é um arbusto conhecido por produzir frutos de sabor adocicado característico, comumente conhecidos como amoras-silvestres. Quimicamente, é uma espécie que apresenta uma elevada diversidade de compostos, no entanto, a presença de moléculas polifenólicas parece desempenhar um papel central no potencial antioxidante da espécie (VERMA *et al*, 2014). O uso tradicional de *R. fruticosus* como alimento e planta medicinal é largamente difundido, sendo à espécie atribuídas atividades antimicrobina, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antidisentérica, antidiabética e antidiarreica (MONFORTE *et al*, 2018).

Embora muitos usos tradicionais estejam registrados na literatura, escassos são os estudos quanto aos efeitos tóxicos da espécie. Desse modo, o presente estudo tem por objetivos avaliar os efeitos do extrato obtido das folhas de *R. fruticosus* sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos após ensaio da toxicidade aguda em modelo animal.

METODOLOGIA

Material vegetal e extrato bruto

Para o desenvolvimento do estudo, foram coletadas as folhas de *R. fruticosus* no município de Frederico Westphalen (27°24'32.0"S 53°25'22.0"W), Rio Grande do Sul, Brasil. Um *voucher* foi depositado no herbário da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões sob o número 12.341. Após a coleta, as folhas foram submetidas ao processo de secagem em estufa, a 40 °C, até atingir peso constante.

Revista Interdisciplinar de Ciências Médicas - Anais - Teresina-PI

CNPJ:14.378.615/0001-60

Registro: ISSN 2594-522X

O material vegetal seco foi triturado em moinho de facas e peneirado (tamis 10 mesh). Após o material vegetal foi macerado em metanol:acetona:água (40:40:20 v/v), totalizando 4 extrações, 48 h/maceração, 2 agitações/dia. O extrato obtido foi filtrado, concentrado e liofilizado, resultando o extrato bruto (ARARUNA *et al*, 2013). Antes de cada experimento, o extrato foi pesado e redissolvido em NaCl 9 % e tween 5 % (veículo).

Animais

Foram utilizados ratos fêmeas (n=9, 2 meses, peso 188/283 g), linhagem *Wistar*, nulíparas, não prenhes. Os animais foram divididos entre grupo controle (n=3) e grupo *R. fruticosus* (n=6). Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da URI sob o número 69, e está adequado a Lei 11.794 de 08 de Outubro de 2008.

Ensaio de toxicidade oral aguda

Este teste foi realizado segundo a Instrução Normativa 423 da OECD (2001). Neste teste, o grupo *R. fruticosus* recebeu uma dose única do extrato de 2000 mg/kg e o grupo controle veículo, ambos através de cânula orogástrica. Após 14 dias avaliando os parâmetros comportamentais, os animais foram anestesiados e as amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca (2 mL sem anticoagulante e 1,5 mL em EDTA- K₂) foram encaminhadas para realização das análises hematológicas e bioquímicas.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Como parâmetros bioquímicos, foram realizadas as análises de Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), ureia, creatinina e glicose. Os métodos colorimétricos foram desenvolvidos no analisador de bioquímica BS-200e *Mindray*. Os parâmetros hematológicos foram avaliados em analisador automatizado Pentra 60. As leituras foram realizadas em triplicata.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente no programa *Graph Pad Stat* através de análise ANOVA *One-Way*, com nível de significância de 5 %, seguido do teste de *Tukey*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da DL50

A administração da planta não produziu alterações no comportamento dos animais e nenhum sinal visível de toxicidade comportamental foi observado, como piloereção, apatia, falta de apetite, agressividade, ataxia, entre outros, durante os 14 dias de análise. Também, não foi observado alteração no consumo de água e ração dos animais, bem como não foi registrado óbito. Dessa forma, o extrato foi classificado, segundo as classificações da OECD (2001), como classe 5 de toxicidade. Entre os estudos de toxicidade da espécie, encontra-se o realizado por Jouad, Maghrani & Eddouks (2002), corroborando com nossos resultados.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Conforme dados da Tabela 1, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$) na contagem de plaquetas do grupo *R. fruticosus* ($601,2 \pm 62,6 \times 10^3/\text{mm}^3$) quando comparados com os ratos do grupo controle ($522,0 \pm 45,9 \times 10^3/\text{mm}^3$), e apesar das alterações na série megacariocitária, não foram observadas outras alterações significativas ($p > 0,005$) nas séries eritrocitárias e leucocitárias que permitissem correlacionar com o número de plaquetas. Apesar de haver possibilidade de *R. fruticosus* causar alteração em alguma etapa ou via de formação plaquetária, não há evidência na literatura quanto a esse efeito para a espécie em questão. Também, não são verificadas pesquisas que demonstrem o aumento na contagem de plaquetas devido a possíveis constituintes bioativos, como polifenóis e flavonoides, presentes em *R. fruticosus* (LÓPEZ-VIDAÑA *et al*, 2019; MONFORTE *et al*, 2018). Portanto, sugere-se a investigação mais aprofundada e com outras metodologias para elucidar esse achado hematológico.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos obtidos do sangue de ratos wistar fêmeas do grupo *R. fruticosus* e grupo controle após ensaio de toxicidade oral aguda.

	Controle	<i>R. fruticosus</i>
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	2,1 \pm 0,06	2,5 \pm 0,9
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	7,3 \pm 0,8	7,7 \pm 0,2
HGB (g/dL)	14,7 \pm 0,9	14,9 \pm 0,5
HCT (%)	41,8 \pm 3,7	43,9 \pm 2,0
MCV (μm^3)	56,7 \pm 0,6	57,0 \pm 1,2
MCH (pg)	20,0 \pm 0,5	19,4 \pm 0,4
MCHC (g/dL)	35,4 \pm 0,9	33,9 \pm 0,7
RDW (%)	101,1 \pm 0,1	11,1 \pm 0,5
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	522,0 \pm 45,9	601,2 \pm 62,6*
Linfócitos (%)	78,9 \pm 0,4	81,5 \pm 6,3
Monócitos (%)	11,5 \pm 0,7	6,3 \pm 0,5
Neutrófilos (%)	8,8 \pm 0,9	11,5 \pm 7,2
Eosinófilos (%)	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1
Basófilos (%)	0,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3

Os valores representam a média \pm desvio padrão da média. (*) Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,01$). Grupo controle (n=3), Grupo *R. fruticosus* (n=6). Glóbulos brancos (WBC), glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina celular média (MCH), concentração média de hemoglobina corpuscular (MCHC), largura de distribuição das células vermelhas (RDW), contagem de plaquetas (PLT).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, as dosagens de AST, ALT, ureia e creatinina não tiveram variações estatisticamente significativas ($p > 0,005$) entre os grupos testados. A partir desses resultados pode-se sugerir que o tratamento agudo com extrato das folhas de *R. fruticosus* não ocasionou sobrecarga renal e/ou hepatotoxicidade, corroborando com os resultados toxicológicos encontrados.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos obtidos do sangue de ratos wistar fêmeas do grupo *R. fruticosus* e grupo controle após ensaio de toxicidade oral aguda

	Controle	<i>R. fruticosus</i>
AST (U/L)	153,7 \pm 19,5	122,6 \pm 10,9
ALT (U/L)	55,0 \pm 6,5	46,4 \pm 12,6
Ureia (mg/dL)	43,3 \pm 2,5	34,4 \pm 3,2
Creatinina (mg/dL)	0,5 \pm 0,03	0,4 \pm 0,05
Glicose (mg/dL)	238,0 \pm 28,0	324,8 \pm 71,9*

Os valores representam a média \pm desvio padrão da média. (*) Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA, seguido de Tukey $p < 0,01$). Grupo controle (n=3), Grupo *R. Fruticosus* (n=6). Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT).

Quanto aos resultados para glicemia, o grupo *R. fruticosus* ($324,8 \pm 71,9 \text{ mg/dL}$) apresentou aumento significativo ($p < 0,01$) em comparação ao grupo controle ($238,0 \pm 28,0 \text{ mg/dL}$). Esses resultados não corroboram com o estudo realizado por Jouad, Maghrani & Eddouks (2002), onde o tratamento com o extrato das folhas de *R. fruticosus* em doses repetidas, via oral, durante 30 dias (100, 200 e 400 mg/Kg),

não alterou significativamente os níveis de glicemia em animais normoglicêmicos. E ainda, foi demonstrado que em modelo animal de diabetes induzido, as mesmas concentrações do extrato de *R. fruticosus* demonstraram efeitos hipoglicemiantes. Contudo, segundo estudo de Alonso, Cadavid & Calleja (1980), utilizando coelhos modelos diabetes induzido e normoglicêmicos, uma dose diária (repetidas) de 5000 mg/kg do extrato das folhas da planta resultou em uma diminuição acentuada nos valores de glicemia nos primeiros dias após a administração. Entretanto, quando a administração foi interrompida, os valores de glicose se elevaram e até superaram os valores iniciais. Conforme estes autores, possivelmente a atividade hipoglicêmica da planta deve-se, em parte, ao possível aumento da liberação de insulina pelas células β -Langerhans, do pâncreas, enquanto os animais recebem o tratamento.

Outro mecanismo a ser considerado é a desregulação no transporte de glicose do meio extra para o intracelular, o qual ocorre através das proteínas de membrana, chamadas de GLUT (FREITAS, CESCHINI & RAMALLO, 2014). Assim, há possibilidade para os resultados encontrados para glicemia decorrerem de um efeito de *R. fruticosus* sobre o metabolismo da insulina ou sobre os receptores para a mesma, nas células dos animais expostos a doses elevadas. Para compreensão deste efeito sobre a glicemia, estudos mais aprofundados nesta área são essenciais.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, pode-se inferir que o extrato bruto obtido das folhas de *R. fruticosus* classifica-se, quanto a toxicidade, na categoria 5 da OECD. No entanto, observa-se, na concentração testada, que o extrato produziu um aumento nos níveis de glicemia e plaquetas nos animais testados, o que sugere a realização de estudos mais aprofundados. Corroborando com os resultados toxicológicos observou-se que os níveis de AST, ALT, ureia e creatinina não sofreram alterações no grupo *R. Fruticosus* quando comparado ao controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORNAS, Waleska C. *et al.* Antidiabetic effects of the medicinal plants. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v.19, n.2a, p.488-500, June 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300024>.
- RAO, T. *et al.* The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacol Res.** 2019;146:104283. doi:10.1016/j.phrs.2019.104283
- VERMA, R. *et al.* Rubus fruticosus (blackberry) use as an herbal medicine. **Pharmacogn Rev.** 2014;8(16):101-104. doi:10.4103/0973-7847.134239
- MONFORTE, M.T. *et al.* Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, and gastroprotective properties of Rubus fruticosus L. fruit juice. **Phytother Res.** 2018;32(7):1404-1414. doi:10.1002/ptr.6078
- OECD. **Guideline 423:** Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf. 2001. Acessado em 10 maio de 2020.
- ARARUNA, M.K.A., *et al.* Phenolic composition and in vitro activity of the Brazilian fruit tree Caryocar coriaceum Wittm. **European Journal of Integrative Medicine.** 2013. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2012.11.007>
- JOUAD, H.; MAGHRANI, M.; & EDDOUKS, M. Hypoglycaemic effect of Rubus fruticosus L. and Globularia alypum L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology.** 2002. doi:10.1016/s0378-8741(02)00118-6

LÓPEZ-VIDANA, E. C., et al. Solar drying kinetics and bioactive compounds of blackberry (s). *Journal of Food Process Engineering*, 2019; 42(4), e13018.

ALONSO, R.; CADAVID, I.; CALLEJA, J.M. A preliminary study of hypoglycemic activity of *Rubus fruticosus*. **Planta Medica**. 1980 ;Suppl:102-106. DOI: 10.1055/s-2008-1075012.

FREITAS, M.C.; CESCHINI, F.L.; RAMALLO, B.T.; Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico. **R. Bras. Ci. e Mov.** 22(3): 139-147, 2014.