



Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol

Jéssica Pereira Costa¹; Natanael Viana Lourenço¹; Camila Carolina de Menezes Patrício Santos²; Adriana da Rocha Tomé¹; Geane Felix de Sousa¹; Damião Pergentino de Sousa³; Reinaldo Nóbrega de Almeida²; Rivelilson Mendes de Freitas^{1*}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

²Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Paraíba, Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

³Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

RESUMO

O fitol, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpeno pertencente ao grupo dos álcoois acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada. É um componente da molécula da clorofila, presente em folhas verdes de várias plantas medicinais. Entretanto, pouco é descrito na literatura sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo fitol. O objetivo do nosso estudo foi avaliar a toxicidade aguda do fitol, após administração intraperitoneal para determinação da dose letal 50% (DL₅₀) e os efeitos sobre os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos tratados com fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg. Os testes para determinação do grau de toxicidade aguda, bem como a investigação da DL₅₀, revelou que o valor é aproximadamente 1153.39 mg/kg. Os camundongos tratados com as doses selecionadas do fitol a partir da DL₅₀ apresentaram todos os parâmetros hematológicos dentro da faixa de referência, observando-se alterações nos valores dos linfócitos. Por sua vez, a maioria dos valores dos parâmetros bioquímicos diminuiu em todas as doses testadas (p<0,05). Em nosso estudo, apenas os animais tratados com fitol na dose de 75 mg/kg demonstraram uma discreta vacuolização no corpo estriado e um discreto comprometimento caracterizado por vacuolização no hipocampo em apenas um dos animais. Nossos resultados indicam que o tratamento com fitol não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais em camundongos. O estudo toxicológico pré-clínico com fitol demonstrou que o produto avaliado possui discreta toxicidade aguda por via intraperitoneal, sendo estes dados uma

contribuição para pesquisas com compostos obtidos de plantas medicinais com potencial farmacológico. Porém, ressalta-se a necessidade de futuras pesquisas que possibilitem comparar os resultados em outras vias, bem como para realizar análises anatomopatológicas dos animais tratados com fitol, para assegurar o uso seguro deste diterpeno.

Palavras-chave: Fitol. Bioquímica. Hematologia. Histologia. Toxicidade aguda.

INTRODUÇÃO

O fitol, (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol), é um diterpeno de fórmula molecular C₂₀H₄₀O, pertencente ao grupo dos álcoois acíclicos insaturados de cadeia longa e ramificada (Figura 1). Este diterpeno apresenta as seguintes características físico-químicas: encontra-se no estado líquido à temperatura ambiente, com densidade de 0.8533 g/cm³ e ponto de ebulição de 202 °C. A solubilidade aquosa do fitol foi determinada em aproximadamente de 0.00327 mg/l (McGinty et al., 2010).

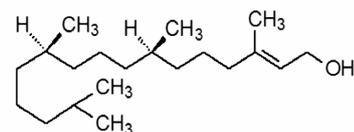


Figura 1. Estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol).

O fitol é particularmente interessante porque é um componente da molécula da clorofila, presente em folhas verdes de várias plantas medicinais, sendo a ela complexado por uma ligação do tipo éster em sua cadeia lateral e, portanto, está presente na natureza de forma abundante. O fitol e seus produtos de degradação têm sido frequentemente usados como biomarcadores em processos químicos e biológicos. Além disso, é considerado a principal fonte de isoprenoídes, com 20 átomos ou menos de carbonos (Hansen, 1980; Rontani & Volkman, 2003).

Em sua rota de degradação, o fitol pode ser convertido a ácido fitânico, o que pode ser associado

Autor correspondente: Rivelilson Mendes de Freitas - Departamento de Bioquímica e Farmacologia - Universidade Federal do Piauí - UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Bairro Ininga - Teresina - Piauí - CEP. 64.049-550 fone: +55-86-3215-5870 - e-mail: rivelilson@pq.cnpq.br

com uma desordem metabólica dos lipídeos, de caráter recessivo, denominada de “Síndrome de Refsum”, em que os indivíduos são incapazes de metabolizar o ácido fitânico e o acumulam em quantidades muito elevadas desse ácido graxo no sangue e em diversos órgãos, incluindo fígado e rins. Corroborando com esses estudos, nós avaliamos a toxicidade aguda deste diterpeno em camundongos (Verhoeven & Jakobs, 2001; Van den Brink & Wanders, 2006; Gloerich et al., 2007).

Este diterpeno é usado na indústria como componente de cosméticos, xampus, sabonetes, detergentes, entre outros. O uso do fitol em nível mundial é aproximadamente de 0,1 a 1,0 toneladas por ano (McGinty, Letizia & Api, 2010). Sob o ponto de vista terapêutico, o fitol e seus análogos demonstraram atividade contra micobactérias e no tratamento da tuberculose. Outros estudos demonstram que o fitol é capaz de induzir a expressão de genes-alvo envolvidos em anormalidades lipídicas em várias doenças comuns, incluindo a obesidade, o diabetes e as displidemias (Goto et al., 2005; Saikia et al., 2010).

Porém, pouco é descrito na literatura sobre os possíveis efeitos toxicológicos produzidos pelo fitol em ensaios pré-clínicos. Diante disto, este estudo teve como objetivo determinar a dose letal 50% (DL₅₀), avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como realizar análises histopatológicas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos tratados por via intraperitoneal com fitol.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados, por experimento, camundongos *Swiss* machos com dois 2 meses de idade e com peso variando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (n° 013/2011).

Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀) do fitol em camundongos

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental, foram utilizados 40 camundongos, divididos em grupos de 10 animais. Foram estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. De forma que, ocorrendo qualquer alteração comportamental em decorrência de tratamentos foi possível inferir uma relação com atividade no SNC (Almeida et al., 1999; Almeida, 2006).

O grupo controle foi tratado com solução de Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; n=10). Após as respectivas administrações, os camundongos foram colocados em gaiolas de polipropileno

(em grupos de cinco animais cada) e observados a cada trinta minutos (30; 60; 120; 180 e 240 min), durante quatro horas. Após os respectivos tratamentos, seguiu-se seguindo-se um protocolo experimental padrão de avaliação comportamental.

Para a determinação da DL₅₀, os animais foram divididos em quatro grupos de 10 camundongos (cinco 5 machos e cinco 5 fêmeas) e separados em gaiolas de acordo com o sexo. Cada grupo, em jejum de 12 horas, recebeu fitol por via intraperitoneal nas doses de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg (quatro doses). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas com ração e água *ad libitum* e observados durante as primeiras 72 horas e por um período de 14 dias para observação dos parâmetros comportamentais, segundo teste hipocrático descrito por Malone & Robichaud (1962).

O número de mortes de cada grupo foi expresso como o percentual do número total de animais que receberam o produto. A determinação da DL₅₀ foi realizada por meio da interpolação semi-logarítmica, sendo postos no eixo das ordenadas os valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas, as doses administradas de produto.

Estudo da toxicidade aguda do fitol em parâmetros bioquímicos e hematológicos

Quarenta camundongos correspondendo a quatro grupos (n=10/grupo) foram tratados, por via intraperitoneal, com fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg emulsionado em Tween 80 0,05% e dissolvido em solução salina 0,9% (grupos FIT 25, FIT 50 e FIT 75), respectivamente. Por sua vez, o grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%).

Após 14 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), e em seguida foi feita a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (Waynforth, 1980). O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab[®]) para determinação dos parâmetros hematológicos e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

Para análise bioquímica, 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 total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALP), bilirrubinas total e direta, proteínas totais e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automático Labmax 240 com sistemas comerciais da LABTEST[®].

Os valores para eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos de volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta, por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/hematology (Siemens). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em extensões coradas com *May-Grünwald-Giemsa*. Em cada ensaio, 100 células foram analisadas e contadas (Malone, 1977; Al-Habori et al., 2002).

Estudo da toxicidade aguda do fitol em cérebros de camundongos

Os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi tratado com veículo (i.p., n=8, grupo controle). Os outros três grupos foram tratados com fitol nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg (i.p.; n=8). Após os tratamentos, os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos parâmetros de toxicidade na triagem farmacológica comportamental discutida anteriormente.

Após o período de observação de 14 dias, todos os grupos foram eutanasiados por anestesia. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 µm foram feitas, coradas em hematoxilina - eosina (HE), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico em um aumento de 40. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos & Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado analisados de acordo com o método descrito anteriormente (Malone, 1977; Al-Habori et al., 2002). Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no hipocampo ou corpo estriado conforme descrito anteriormente por Campêlo et al., (2011).

Análises estatísticas

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram determinadas por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados das análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos tratados com fitol

Os camundongos tratados com a dose de 25, 50 e 75 mg/kg (i.p), do fitol apresentaram todos os parâmetros hematológicos dentro da faixa de referência, observando-se pequenas alterações no valor dos linfócitos, mas sem importância clínica ($p < 0,05$; Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos Swiss, tratados com fitol por via intraperitoneal.

Parâmetros	Controle (n=10)	FIT 25 (n=10)	FIT 50 (n=10)	FIT 75 (n=10)
Glicose (mg dL ⁻¹)	93,67 ± 1,69	92,50 ± 1,32	95,40 ± 2,53	91,40 ± 1,65
Uréia (mg dL ⁻¹)	50,89 ± 1,45	38,70 ± 3,80 ^a	43,60 ± 4,44 ^a	40,60 ± 3,43 ^a
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,42	0,42 ± 0,05 ^a	0,44 ± 0,05 ^a
Ácido úrico (mg dL ⁻¹)	2,61 ± 0,04	0,87 ± 1,22 ^a	0,87 ± 1,22 ^a	0,86 ± 0,10 ^a
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	100,6 ± 3,12	60,60 ± 8,09 ^a	81,30 ± 8,58 ^a	82,80 ± 3,32 ^a
CT (mg dL ⁻¹)	86,07 ± 0,57	87,27 ± 11,51	83,91 ± 9,19	86,91 ± 11,73
Proteínas totais (mg dL ⁻¹)	6,64 ± 1,03	6,60 ± 0,13	6,89 ± 0,12	6,44 ± 0,16
AST (U mL ⁻¹)	49,67 ± 3,62	46,90 ± 1,86 ^a	46,60 ± 4,18 ^a	44,50 ± 5,94 ^a
ALT (U mL ⁻¹)	91,67 ± 1,92	83,40 ± 3,01 ^a	83,60 ± 2,93 ^a	88,50 ± 2,77 ^a
Fosfatase alcalina (U l ⁻¹)	157,6 ± 0,97	106,1 ± 1,30 ^a	113,4 ± 4,72 ^a	118,4 ± 4,17 ^a
Bilirrubina total (mg dL ⁻¹)	0,26 ± 0,02	0,15 ± 0,06 ^a	0,05 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,03 ^a
Bilirrubina direta (mg dL ⁻¹)	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,004 ^a	0,02 ± 0,005 ^a	0,02 ± 0,005 ^a

Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos machos Swiss, tratados de forma aguda por via intraperitoneal com veículo (Controle, n = 10) e com fitol nas doses 25 mg/kg (FIT 25, n = 10), 50 mg/kg (FIT 50, n = 10) e 75 mg/kg (FIT 75, n = 10). Os valores representam a média ± E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n - representa o número de animais em cada grupo. ^ap < 0,05, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

RESULTADOS

Determinação da Dose Letal 50% (DL₅₀)

O fitol não alterou de forma significativa a massa corpórea dos animais. Durante o tratamento, não foram observados sinais clínicos de toxicidade e nenhuma morte foi registrada. Não houve alteração no consumo de água e ração dos animais.

Os resultados mostram que a administração intraperitoneal, do fitol, de forma geral, não produz efeitos tóxicos no comportamento de camundongos Swiss adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade comportamental foi observado. Após o tratamento com as doses de 25, 50 e 75 mg/kg, foi observada a presença de analgesia, bem como não verificamos a presença de alterações na resposta ao toque e ambulação. Além disso, a atividade geral dos camundongos não foi alterada.

O ensaio para determinação do grau de toxicidade aguda, bem como a investigação da dose letal 50% (DL₅₀), revelou que o valor é de aproximadamente 1153.39 mg/kg para camundongos tratados com fitol por via intraperitoneal e observados durante 14 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos Swiss, tratados com fitol por via intraperitoneal.

Grupos	Dose (mg kg ⁻¹)	Número de animais por grupo	Número de mortes por grupo
Veículo	00	10	00
Fitol	250	10	01
	500	10	02
	1000	10	06
	2000	10	10

Determinação da dose letal 50% (DL₅₀) em camundongos machos e fêmeas Swiss, tratados por via intraperitoneal de forma aguda com veículo (Controle, n = 10) e com fitol nas doses 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg observados durante 14 dias.

A tabela demonstra os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em camundongos submetidos aos ensaios toxicológicos pré-clínicos, por via intraperitoneal. Houve pequenas alterações nos parâmetros analisados ($p < 0,05$) sem indicativo de importância clínica. Os valores de uréia, ácido úrico, triglicerídeos, AST, ALT, fostatase alcalina, bilirrubina total e direta, diminuíram em relação ao controle em todas as doses testadas ($p < 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3. Resultados dos parâmetros hematológicos de camundongos Swiss, tratados com fitol por via intraperitoneal.

Parâmetros	Controle (n=10)	FIT 25 (n=10)	FIT 50 (n=10)	FIT 75 (n=10)
Hemácias (mm^3)	8,60 \pm 0,23	8,91 \pm 0,30	8,62 \pm 0,44	8,78 \pm 0,39
Hemoglobina (g dL^{-1})	14,00 \pm 0,15	13,83 \pm 0,47	13,91 \pm 0,55	14,50 \pm 0,68
Hematócrito (%)	43,33 \pm 0,28	46,56 \pm 1,61	47,97 \pm 1,85	42,21 \pm 2,27
VCM (fL)	48,78 \pm 0,27	49,86 \pm 0,60	49,20 \pm 1,20	45,67 \pm 0,41
HCM (pg)	15,56 \pm 0,34	17,14 \pm 0,16	16,36 \pm 0,44	18,22 \pm 0,13
CHCM (g dL^{-1})	34,22 \pm 0,62	34,37 \pm 0,43	31,93 \pm 0,41	32,76 \pm 0,31
Plaquetas (mm^3)	392,4 \pm 0,83	383,4 \pm 52,73	386,8 \pm 96,63	397,6 \pm 79,04
Linfócitos (%)	78,12 \pm 0,31	83,36 \pm 2,02	76,63 \pm 4,28	75,57 \pm 3,75

Parâmetros hematológicos obtidos de camundongos machos Swiss, tratados de forma aguda por via intraperitoneal com veiculo (Controle, $n = 10$) e com fitol nas doses 25 mg/kg (FIT 25, $n = 10$), 50 mg/kg (FIT 50, $n = 10$) e 75 mg/kg (FIT 75, $n = 10$). Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. n – representa o número de animais em cada grupo. $^*p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle (ANOVA e teste *t*-Student–Newman–Keuls como post hoc teste).

Resultados das análises histopatológicas em camundongos tratados com fitol

A figura 2 demonstra as alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos. Em nosso estudo, apenas os animais tratados com fitol (75 mg/kg; FIT 75) demonstraram uma discreta vacuolização no corpo estriado em apenas um dos animais (12,5%). Também foi detectado um comprometimento de 12% do corpo estriado nesse mesmo grupo, quando comparado ao controle (Figura 2).

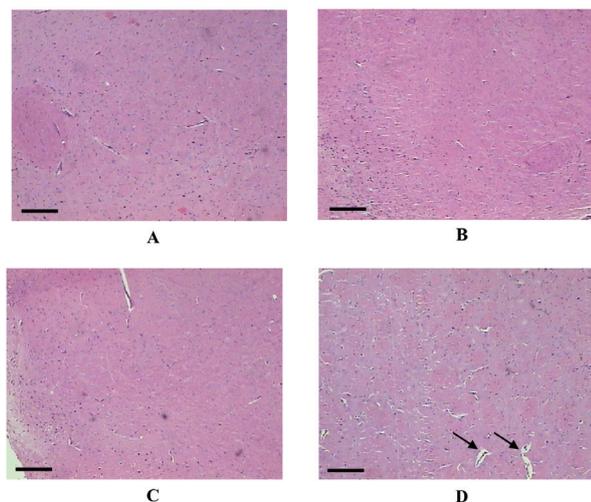


Figura 2. Avaliação da toxicidade aguda no corpo estriado de camundongos tratados com fitol.

A - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos observados por 24 h após administração do veiculo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, i.p.; $n=8$, Controle; Hematoxilina – Eosina (HE) X40; Barra de Escala = 10 μm). B e C - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos tratados com fitol nas doses de 25 e 50 mg/kg (FIT 25 e FIT 50, i.p.; $n=8$; HE X40; Barra de Escala = 10 μm), respectivamente. D - Alteração histológica demonstrando discreta vacuolização (seta preta) no corpo estriado de camundongos adultos tratados com fitol na dose de 75 mg/kg (FIT 75, i.p.; $n=8$; HE X40; Barra de Escala = 10 μm).

Já na figura 3, releva as principais mudanças histopatológicas no hipocampo dos camundongos adultos. Por sua vez, apenas nos animais tratados com fitol, na dose de 75 mg/kg (FIT 75), apresentaram alteração histopatológica (12,5%) em um dos animais com um discreto comprometimento caracterizado por uma discreta vacuolização no hipocampo (16%; Figura 3). Por sua vez, os grupos tratados somente com veiculo (grupo controle) ou fitol nas doses de 25 mg/kg (FIT 25) e 50 mg/kg (FIT 50) não apresentaram nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado e hipocampo (Figuras 2 e 3, respectivamente).

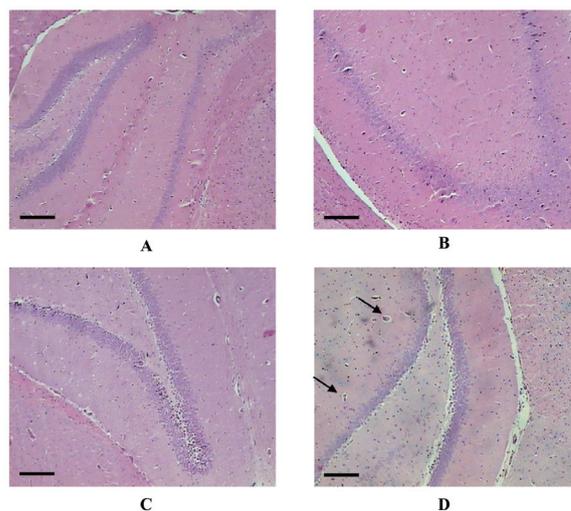


Figura 3. Avaliação do efeito do tratamento com fitol no hipocampo de camundongos adultos.

A - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos observados por 24 h após administração do veiculo - (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%, i.p.; $n=8$, Controle; Hematoxilina – Eosina (HE) X40; Barra de Escala = 10 μm); B e C - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos tratados com fitol nas doses de 25 e 50 mg/kg (FIT 25 e FIT 50, i.p.; $n=8$; HE X40; Barra de Escala = 10 μm), respectivamente. D - Alteração histopatológica demonstrando um discreto comprometimento caracterizado por discreta vacuolização (seta preta) no hipocampo de camundongos tratados com fitol na dose de 75 mg/kg (FIT 75, i.p.; $n=8$; HE X40; Barra de Escala = 10 μm).

DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que a administração aguda do fitol, de forma geral, não produziu efeitos tóxicos em camundongos Swiss adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado. O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (Jahn & Günzel, 1997).

Embora alguns parâmetros do perfil bioquímico dos animais estivessem dentro dos valores de referência (glicose, colesterol total e proteínas totais), houve uma diminuição dos valores de uréia, creatinina, ácido úrico, triglicerídeos, AST, ALT, fostatase alcalina, bilirrubina total e direta.

A uréia, o produto final do metabolismo protéico, é excretada pelos rins. Os túbulos renais reabsorvem 40% desse produto, portanto, os níveis sanguíneos desse parâmetro constituem uma indicação da função renal e podem servir como índice da taxa de filtração glomerular (Schosler et al., 2001), teoricamente, a creatinina é a mais indicada para verificar a função renal, uma vez que a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante, porém não é reabsorvida nos túbulos renais como a uréia (Steven & Scott, 2002).

A redução nos níveis plasmáticos de uréia e ácido úrico fornecem indícios de uma melhora da função renal, sugerindo o seu uso no tratamento da insuficiência renal aguda ou, ainda, pode indicar uma diminuição do catabolismo protéico (Dantas et al., 2006). No entanto, a elevação nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo protéico (Vijayalakshmi et al., 2000; Adebayo et al., 2003). No nosso estudo observou-se uma diminuição nos níveis séricos de creatinina, uréia e ácido úrico. Dessa forma podemos ainda sugerir que não há sobrecarga renal. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre a toxicidade aguda com doses repetidas, e para a avaliação da toxicidade subcrônica e crônica em roedores.

Os triglicerídeos são depósitos de combustível metabólicos armazenados por células especializadas chamadas adipócitos, estas células formam o tecido adiposo que está presente sob a pele, na cavidade abdominal e nas glândulas mamárias (Lehninger et al., 2005). A maior parte da estocagem de gordura no tecido adiposo e nas células musculares é na forma de triglicerídeos (Champe & Harvey, 2000). O aumento dos níveis séricos dos mesmos é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares e há urgente necessidade de baixar os níveis de triglicerídeos no plasma, diminuindo, assim, o risco de doenças cardíacas (Austin et al., 1998).

Com relação aos níveis séricos dos triglicerídeos foi detectada uma diminuição significativa nos camundongos tratados com todas as três doses de fitol. Diante dos efeitos na redução sérica dos triglicerídeos pode ser sugerido o uso do fitol no tratamento das dislipidemias. No entanto, essa avaliação precisa ser investigada de forma mais detalhada, inclusive em modelos animais de dislipidemia.

Na prática clínica de pequenos animais é comum a detecção de anormalidades nas atividades séricas das enzimas hepáticas, as quais são consideradas indicadores sensíveis de perturbações hepatobiliares. Muitos processos patológicos envolvendo o fígado podem causar elevações proporcionalmente distintas nas enzimas hepáticas, uma vez que há a variação na distribuição de cada enzima específica no lóbulo hepático, bem como essas mudanças podem ser induzidas por agentes exógenos químicos incluindo fármacos (Sharon & Center, 1995).

As análises das enzimas transaminases (ALT e AST) e da fosfatase alcalina são importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (Martin et al., 1981). As transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e a ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. A AST e ALT são considerados sensíveis indicadores de dano hepatocelular e dentro dos limites pode fornecer uma avaliação quantitativa do grau de danos sofridos pelos hepatócitos (Miller & Gonçalves, 1999; Al-Habori et al., 2002). O presente estudo sugere que o uso do fitol de forma aguda pode não ser hepatotóxico, uma vez que foi observada uma diminuição significativa da AST e ALT, sugerindo que o composto pode induzir um efeito hepatoprotetor que precisa ser melhor investigado.

A fosfatase alcalina (FAL) é uma enzima fosfohidrolase, encontrada em vários tecidos, com maiores

concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FAL, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar que pode ser induzida por medicamentos. Portanto, essa enzima pode ser um marcador importante da atividade da membrana plasmática e do retículo endoplasmático durante tratamentos farmacológicos e em algumas condições patológicas. O aumento da atividade sérica de FAL pode ocorrer em condições de colestase, intra e extrahepática, por indução com drogas ou hormônios, pela hiperatividade osteoblástica e em processos necróticos (Wright & Plummer, 1974; Miller & Gonçalves, 1999). Como foi observado no presente estudo ocorreu uma diminuição significativa na fosfatase alcalina em todas as doses testadas, indicando que o fitol pode ser usado de forma segura já que não induziu nenhuma alteração bioquímica indicativa de hepatopatias no soro dos camundongos.

A bilirrubina é um pigmento tetrapirrólico. Cerca de 70 a 80% é derivada da degradação da hemoglobina (Hb) de hemácias senescentes (≤ 300 mg/dia); 20 a 30% são derivados das células eritróides da medula destruídas prematuramente e de hemoproteínas de outros locais do organismo (principalmente fígado). A degradação das hemácias nas células reticuloendoteliais (RE) da origem a bilirrubina, que se liga a albumina para o transporte ao fígado, sendo então conjugado com ácido glicurônico que são transportados aos canalículos biliares e, em seguida, ao duodeno. No intestino, a bilirrubina é hidrolisada a bilirrubina não conjugada e reduzida a urobilinogênios por bactérias; 80 a 90% são excretados nas fezes inalterados ou oxidados (urobilinas); 10 a 20% são reabsorvidos, retornam ao fígado e são reexcretados. Menos de 3 mg/dL são filtrados por meio dos glomérulos para a urina como urobilinogênio. Bilirrubina conjugada (direta) é aumentada em doenças hereditárias e durante o dano celular hepático. Bilirrubina não conjugada (indireta) pode estar aumentada em doenças hemolíticas, doenças hereditárias e durante o tratamento com medicamentos (Wallach, 2009).

Quanto ao estudo hematológico, todos os parâmetros hematológicos estão dentro da faixa de referência, observando-se um pequeno aumento no valor dos linfócitos. A contagem diferencial para neutrófilos, linfócitos e monócitos revelou, embora, dentro dos limites de referência (Harkness & Wagner, 1993), discretas alterações, porém sem indicativo de importância clínica, sugerindo o seu uso de forma segura em humanos no tratamento de doenças.

Estudos anteriores demonstram que a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas envolve várias alterações em nível neuroquímico e histológico em regiões cerebrais que precisam ser investigadas fazendo uso de compostos naturais com possível efeito neuroprotetor (Barros et al., 2007; Xavier et al., 2007; Freitas et al., 2011).

Dessa forma, decidimos investigar os efeitos do fitol em cérebros de camundongos, para avaliar a sua neurotoxicidade contra neurônios hipocámpais e estriatais, uma vez que, a literatura demonstra várias propriedades farmacológicas para esse diterpeno em estudo (Kitareewan et al., 1996; Chinetti et al., 2000; Hurberle et al., 2009).

Em nossos estudos histopatológicos observamos um pequeno número de animais com lesão cerebral e um

comprometimento de forma não significativa das áreas investigadas apenas no grupo tratado com fitol na maior dose. Além disso, foi possível detectar que no corpo estriado e hipocampo de animais tratados com as doses de 25 e 50 mg/kg de fitol, não houve nenhuma alteração histopatológica, bem como não foi detectado nenhum grau de comprometimento das áreas analisadas desses animais.

A morte neuronal observada no hipocampo e corpo estriado dos animais durante o estabelecimento de desordens neurodegenerativas pode ser atribuída a excitotoxicidade produzida pelo sistema glutamatérgico (Tomé et al., 2010). Entretanto, nossos estudos histopatológicos de animais tratados com fitol, não demonstraram produzir dano neuronal no corpo estriado e hipocampo de forma significativa, sugerindo que esse diterpeno não produz neurotoxicidade. A literatura sugere que o estresse oxidativo pode estar envolvido na instalação de várias doenças do sistema nervoso central (SNC), provavelmente pelo aumento da produção de radicais livres, e há uma diminuição da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas (Shults & Haas, 2005; Freitas et al., 2005; Chatuverdi & Beal, 2008).

Nossos resultados indicam que o tratamento com fitol não produz alterações hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais em camundongos adultos. O tratamento agudo com fitol demonstrou ausência de toxicidade em parâmetros hepáticos, renais e neuronais, bem como reduziu os níveis de triglicérides que precisam ser melhores investigados em modelos animais de hipercolesterolemia. Devido à ausência de toxicidade aguda proeminente verificada em nossos experimentos durante 14 dias de observação, novos estudos comportamentais e neuroquímicos com esse diterpeno precisam ser realizados, para esclarecer seu mecanismo de ação e justificar o uso do fitol de forma segura e eficaz, como um potencial agente terapêutico para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a CAPES e a FAPEPI pelo apoio financeiro.

ABSTRACT

Assessment of acute toxicity and histopathological changes in mice treated with phytol

Phytol (3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol) is a diterpene belonging to the group of acyclic unsaturated long-chain branched alcohols. It is a component of the chlorophyll molecule, present in green leaves of various medicinal plants. However, there is little in the literature about the possible toxic effects produced by phytol. The aim of our study was to assess the acute toxicity of phytol after intraperitoneal (ip) administration, by determining its 50% lethal dose (LD₅₀) and effects on biochemical parameters, hematology and the histopathology of the hippocampus and corpus striatum of adult mice treated with doses of 25, 50 and 75 mg/kg phytol. The acute toxicity tests and investigation of

the LD₅₀ revealed its value to be approximately 1153.39 mg/kg. Mice treated with sublethal doses of phytol based on the LD₅₀ showed all hematological parameters within their reference ranges, with small changes in the lymphocyte count. In turn, most of the biochemical parameters decreased at all doses tested (p<0.05). In our study, only those animals treated with phytol at a dose of 75 mg/kg showed slight vacuolation in the corpus striatum and a slight impairment characterized by vacuolation in the hippocampus in one animal. Our results indicate that treatment with phytol produces no hematological, biochemical or brain histopathological changes in the mice. The preclinical toxicological study with phytol showed that it has slight acute toxicity when injected ip. These data contribute to research on natural compounds obtained from medicinal plants with pharmacological potential. However, we emphasize the need for future research to enable results obtained by other routes to be compared, as well as to conduct pathological analysis in animals treated with phytol, to ensure the safe use of this diterpene.

Keywords: Acute toxicity. Biochemistry. Hematology. Histology. Phytol.

REFERÊNCIAS

- Adebayo JO, Yakubu MT, Egwim EC, Owoyele VB, Enaibe BU. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *J Ethnopharmacol.* 2003;88(1):69-72.
- Al-Habori M, Al-Aghbari A, Al-Mamary M, Baker M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *J Ethnopharmacol.* 2002;83(3):209-17.
- Almeida RN. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. 384 p.
- Almeida RN, Falcão ACGM, Diniz RST, Quintans-Júnior LJ, Polari RM, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Duarte JC, Ferreira CD, Antonioli AR, Araújo CC. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Rev Bras Farmacogn.* 1999;80:72-6.
- Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 1998;81(4A):7-12.
- Barros DO, Xavier SM, Barbosa CO, Silva RF, Maia FD, Oliveira AA, Freitas RM. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2007;416(3):227-30.
- Campêlo LML, Feitosa CM, Tomé AR, Freitas RM. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.* 2011;9(6):440-5.

- Champe PC, Harvey R. Bioquímica ilustrada. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2000. 446p.
- Chatuverdi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1147:395-412.
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* 2000;49(10):497-505.
- Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani A, Ciomar, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci Health Sci.* 2006;28(2): 165-70.
- Freitas RM, Souza FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. *FEBS J.* 2005;272(6):1307-12.
- FreitasRM,DejiangFengD,JordanJ.Neuropharmacological effects of lipoic acid and ubiquinone on δ -aminolevulinic dehydratase, Na^+ , K^+ -ATPase, and Mg^{2+} -ATPase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Fund Clin Pharmacol.* 2011;25(2):211-6.
- Gloerich J, Van Den Brink DM, Ruiter JPN, Van Vlies N, Vaz FM, Wanders RJA, Ferdinandusse S. Metabolism of phytol to phytanic acid in the mouse, and the role of PPAR α in its regulation. *J Lipid Res.* 2007;48(1):77-85.
- Goto T, Takahashi N, Kato S, Egawa K, Ebisu S, Moriyama T, Fushiki T, Kawada T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(2):440-5.
- Harkness SE, Wagner JE. Biologia e clinica de coelhos roedores. São Paulo: Livraria Roca; 1993.
- Hansen RP. Phytol: its metabolic products and their distribution. A review. *N Z J Sci.* 1980;23(3):259-75.
- Huberle A, Beyeen AD, Ockinger J, Ayturan M, Jagodic M, De Graaf KL, Fissolo N, Marta M, Olofsson P, Hultqvist M, Holmdahl R, Olsson T, Weissert R. Advanced Intercross Line Mapping Suggests That Ncf1 (Ean6) Regulates Severity in an Animal Model of Guillain-Barre Syndrome. *J Immunol.* 2009;182(7):4432-8.
- Jahn AI, Günzel PKH. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol.* 1997;11(2-3):171-8.
- Kitareewan S, Burka LT, Tomer KB, Parker CE, Deterding LJ, Stevens RD, Forman BM, Mais DE, Heyman RA, McMorris T, Weiberger C. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Mol Biol Cell.* 1996; 7(8):1153-1166.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. 4th ed. New York: Freeman and Company; 2005. 1119 p.
- Malone MH. Pharmacological approaches to natural products screening and evaluation. In: Wagner, H.; Wolf, P, editors. *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity.* Berlin: Springer Verlag; 1977. p. 23-53.
- Malone MH, Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia.* 1962;25:320-332.
- Martin DW, Mayes PA, Rodwell YW. HARPER'S Review of Biochemistry. Califórnia: Lange Medical; 1981. 688 p.
- McGinty D, Letizia CS, Api AM. Fragrance material review on phytol. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(suppl 3):59-63.
- Miller O, Gonçalves RR. Laboratório para o clínico. 8. ed. São Paulo: Editora Arheneu; 1999. 607 p.
- Paxinos G, Watson C. The brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press; 1986.
- Rontani JF, Volkman JK. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. *Org Geochem.* 2003;34(1):1-35.
- Saikia D, Parihar S, Chanda D, Ojha S, Kumar JK, Chanotiya CS, Shanker K, Negi AS. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(2):508-12.
- Schossler D, Alievi MM, Emanuelli MP, Schossler JP. Função renal de cães tratados com doses terapêuticas de flunixin meglumine e Ketoprofeno durante e trans e pós-operatório. *Acta Cir Bras.* 2001;16(1):46-51.
- Sharon A, Center DMV. Avaliação fitoquímica da função hepática no cão e gato. In: Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais. 1995. p. 1166-83.
- Shults CW, Haas R. Clinical trials of coenzyme Q₁₀ in neurological disorders. *Biofactors.* 2005;25(1-4):117-26.
- Steven LS, Scott MS. Urinary sistem. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology.* Iowa: Iowa State; 2002. p. 277-336.
- Tomé AR, Ferreira PMP, Freitas RM. Inhibitory action of antioxidants (ascorbic acid or alfa-tocopherol) on seizures and brain damage induced by pilocarpine in rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 2010;68(3):355-361.
- Van den Brink, D.M.; Wanders, R.J.A. 2006. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cell Mol Life Sci.* 63(15):1752-65.
- Verhoeven NM, Jakobs C. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Prog. Lipid Res.* 2001;40(6):453-66.
- Vijayalakshmi T, Muthulakshmi V, Sachdanandam P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with

serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. J Ethnopharmacol. 2000;69(1):9-15.

Xavier SML, Barbosa CO, Barros DO, Silva RF, Oliveira AA, Freitas RM. Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. Neurosci Lett. 2007;420(1):76-9.

Waynforth BH. Injection techniques. In: Experimental and Surgical Techniques in the Rat. London: Academic Press; 1980.

Wallach JB. Interpretação de exames laboratoriais. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. 1465 p.

Wright PJ, Plummer DT. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. Biochem Pharm. 1974;23:65-73.

Recebido em 13 de outubro de 2011.

Aceito para publicação em 8 de maio de 2012.