

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA RIPARINA B SEGUNDO PROTOCOLO Nº 423 (OCDE)

¹Aldenora Maria Ximenes Rodrigues; ²Camila Emanuelle da Silva Ferreira; ³Ranyelison Silva Machado; ⁴Aldeídia Pereira de Oliveira.

¹Doutora em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO);

²Graduanda em farmácia pelo Centro Universitário Maurício de Nassau – CAMPUS REDENÇÃO;

³Graduado em Biomedicina pelo Centro Universitário Maurício de Nassau – CAMPUS REDENÇÃO; ⁴Doutora em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos pela Universidade Federal da Paraíba;

Área temática: Inovações em Farmacologia

Modalidade: Pôster simples

E-mail do autor: camilaemanuelleferreira@gmail.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: A riparina B apresenta atividades farmacológicas significativas, tais como efeitos ansiolíticos e antidepressivos em modelos animais e ansiedade e depressão. Entretanto, há um “gap” quanto a estudos toxicológicos. **OBJETIVO:** Avaliar a toxicidade por dose única da riparina B *in vivo*, com intuito de verificar sua segurança para uso como substância bioativa em formulações farmacêuticas. **MÉTODOS:** O estudo experimental de toxicidade *in vivo* ocorreu de acordo com a diretriz 423, preconizada pelo guia para ensaios toxicológicos *Guideline for Testing of Chemicals* da OCDE. A riparina B foi sintetizada no laboratório de química farmacêutica da Universidade Federal do Piauí e emulsificada com Tween 80 0,05%. Os animais foram tratados com a riparina B nas doses 300 e 2000 mg/kg, via oral (gavagem), em uma única dose e observados durante 14 dias. Foram realizadas análises comportamentais, hematológicas e bioquímicas. **RESULTADOS:** Durante o ensaio de toxicidade aguda com dose única da riparina B não foi observada nenhuma alteração comportamental ou alteração nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, nem modificação de reflexos ou morte dos animais tratados. A ausência de mortes nos grupos tratados após 14 dias de observação determinou o valor de DL₅₀ acima de 2000 mg/kg, classificando a riparina B como uma substância de baixa toxicidade aguda. **CONCLUSÃO:** A riparina B foi considerada uma substância de baixa toxicidade, conforme o protocolo utilizado, o que sugere a sua utilização de forma segura como uma molécula ativa.

Palavras-chave: Riparina; Toxicidade Aguda; Fármaco.

1 INTRODUÇÃO

As riparinas são alcaloides, do tipo alcalaminas, naturais (riparinas I, II e III) ou sintéticas (A, B, C, D, E e F) com base nas moléculas isoladas da espécie *Aniba riparina* (Mez), popularmente conhecida como “louro” (LEITE, 2008). A literatura relata diversas atividades biológicas de grande relevância atribuídas às riparinas, em especial a nível de Sistema Nervoso Central (SNC), sendo capazes de desencadear efeitos ansiolíticos e antidepressivos em modelos animais de ansiedade e depressão (ARAÚJO *et al.*, 2018; LOPES *et al.*, 2018; CHAVES *et al.*, 2019), sem afetar a locomoção dos animais testados (NUNES *et al.*, 2015).

Apesar dos potenciais benefícios para a saúde, quanto à toxicidade, os poucos estudos realizados relatam baixa toxicidade e citotoxicidade (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2000; NUNES *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2018; MAFUD *et al.* 2018). Entretanto, não há estudos que relatam a toxicidade *in vivo* da riparina B.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo conhecer a toxicidade por dose única da riparina B *in vivo*, utilizando-se do protocolo nº 423 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), com intuito de verificar sua segurança para uso como substância bioativa em formulações farmacêuticas.

2 MÉTODO

Para este estudo experimental, a riparina B foi sintetizada no laboratório de química farmacêutica da Universidade Federal do Piauí, emulsificada com Tween 80 0,05% e dissolvida em água MilliQ. Os animais foram tratados com a riparina B nas doses 300 e 2000 mg/kg, via oral (gavagem), em uma única dose e observados durante 14 dias. Para o grupo controle foi utilizado Tween 80 0,05% dissolvido em água MilliQ.

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, fêmeas, pesando de 25 a 30 g, com aproximadamente 2 meses de idade, provenientes do biotério central da Universidade Federal do Piauí. Todos os experimentos propostos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação da Universidade Federal do Piauí sob número de protocolo nº 275/2016.

Todos os dados coletados foram realizados em salas com temperatura equivalente a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, mantida em ciclo claro/escuro de 12 horas, disponibilizando aos animais livre acesso à água e à comida. Para o estudo da toxicidade aguda foi adotada a diretriz 423, preconizada pelo guia para ensaios toxicológicos *Guideline for Testing of Chemicals* da OECD. Todas as observações foram sistematicamente registradas por meio de um formulário google construído pelos pesquisadores. Foram avaliados os seguintes sinais seguindo o screening hipocrático diário: atividade geral, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção abdominal, reflexo de endireitamento, força para agarrar, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, ptose, piloereção, cianose e morte.

Ao fim dos 14 dias de observação, todos os animais utilizados foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (5 mg/kg, i.p.) para coleta de sangue total por punção cardíaca para a avaliação hematológica e bioquímica e posterior eutanásia por guilhotina. A avaliação hematológica foi realizada observando os seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas, dosagem de hemoglobina, verificação de hematócrito e dos índices hematimétricos, hemoglobina globular média (HGM), volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM) em sangue total contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em analisador automático de células hematológicas SDH-3 *Vet Labtest*. Já a avaliação bioquímica foi realizada através da observação dos seguintes marcadores: glicose, Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, uréia e creatinina em amostras de soro por meio do analisador bioquímico automático A15 *Biosystems*.

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), avaliados por meio da análise de variância (one-way ANOVA) seguida do teste Tukey como post hoc teste por meio do software GraphPad Prism (versão 6.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A observação direta durante os 14 dias demonstrou ausência de alteração comportamental, modificação nos reflexos ou morte dos animais expostos com as doses testadas, igualando macroscopicamente os grupos Riparina B 300 e Riparina B 2000 ao grupo controle. Em virtude da ausência de mortes nos grupos tratados, obteve-se o valor de DL_{50} acima de 2000 mg/kg, classificando a riparina B como uma substância de baixa toxicidade aguda, incluindo-a na categoria 5 segundo a *Globally Harmonised System* (GHS).

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados das análises hematológicas e bioquímicas, respectivamente.

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss* tratados com Rip B.

Parâmetros	Controle	Rip B 300	Rip B 2000
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$6,84 \pm 0,06$	$8,35 \pm 0,30$	$6,18 \pm 0,86$
Hemoglobina (g/dL)	$13,15 \pm 0,07$	$15,80 \pm 0,84$	$11,60 \pm 2,12$
Hematócrito (%)	$36,2 \pm 5,93$	$40,15 \pm 1,62$	$29,05 \pm 4,17$
HCM (pg)	$19,21 \pm 0,07$	$18,90 \pm 0,32$	$18,69 \pm 0,80$
VCM (fL)	$47,80 \pm 1,83$	$48,10 \pm 0,14$	$47,10 \pm 0,14$
CHCM (g/dl)	$36,75 \pm 6,29$	$39,30 \pm 0,56$	$39,75 \pm 1,62$
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	$4,21 \pm 2,99$	$6,35 \pm 0,63$	$5,95 \pm 4,45$
Plaquetas ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	$0,80 \pm 0,50$	$1,04 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,43$

Valores obtidos após tratamento com Tween 80 (0,05%) dissolvido em água Milli-Q ($n = 3$ por grupo) e riparina B nas doses de 300 e 2000mg/kg ($n = 3$ por grupo). Legenda: HCM = Hemoglobina corpuscular média; VCM = Volume corpuscular médio; CHCM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss* tratados com Rip B.

Parâmetros	Controle	Rip B 300	Rip B 2000
Glicose (mg/dL)	$116,3 \pm 3,84$	$165,7 \pm 15,21$	$132,00 \pm 20,42$
ALT (U/L)	$45,00 \pm 3,00$	$41,67 \pm 2,33$	$44,67 \pm 4,63$
AST (U/L)	$127,7 \pm 22,53$	$117,0 \pm 6,24$	$164,3 \pm 37,84$
FA (U/L)	$115,5 \pm 40,50$	$159,7 \pm 55,15$	$85,67 \pm 26,97$

Ureia (mg/dL)	53,00 ± 9,00	52,33 ± 3,28	47,33 ± 8,37
Creatinina (mg/dL)	0,38 ± 0,03	0,36 ± 0,008	0,37 ± 0,02

Valores obtidos após tratamento com Tween 80 (0,05%) dissolvido em água Milli-Q (n = 3 por grupo) e riparina B nas doses de 300 e 2000mg/kg (n = 3 por grupo). Legenda: ALT=Alanina aminotransferase; AST=Aspartato aminotransferase; FA=Fosfatase Alcalina.

A ausência de alterações no *screening* hipocrático, assim como a ausência de sinais de toxicidade no acompanhamento durante os 14 dias de experimento caracterizam de forma preliminar a baixa interferência da riparina B em parâmetros fisiológicos dos animais e sua baixa toxicidade. Em testes toxicológicos com as riparinas naturais I, II e III, realizados por Castelo-Branco et al. (2000), os pesquisadores relataram que a administração das Riparinas I e II, por via oral, em doses de 1g/Kg, não causaram morte de camundongos dentro de um período de 48h. Mostraram também que a administração das riparinas I e II por via intraperitoneal, em doses semelhantes, também não foram letais. Entretanto, o estudo de Castelo-Branco et al. (2000) infere também que a administração da riparina III causou mortes dependentes da dose, onde obteve-se o valor de DL_{50} de 104,2 mg/kg. Acredita-se que esse comportamento seja em virtude da estrutura, no qual o grau de hidroxilação da fração benzoíla aumenta a atividade biológica bem como a toxicidade da molécula.

Os resultados do perfil hematológico sugerem que a riparina B não causou danos ou alterações morfológicas nas estruturas normalmente encontradas no sangue periférico, sugerindo que aplicação aguda da substância não foi capaz de provocar modificações na medula óssea em relação ao processo de hematopoese ou alterações celulares decorrentes de danos periféricos. Houve apenas uma variação na dose de 300 mg/Kg em relação ao número de hemácias que pode ser atribuída a problemas na fase pré-analítica, pois houveram amostras com volume insuficiente.

Também não houve alteração no perfil bioquímico em relação a função hepática e a função renal, podendo-se inferir que não produz efeitos tóxicos sobre os parâmetros analisados podendo ser usado de forma segura em outros ensaios pré-clínicos para estabelecer a toxicidade em outras espécies por um período maior de tempo e com doses repetidas da riparina B, o que complementa os resultados de Araújo et al. (2018), que também não apresentou variações relevantes nos parâmetros hematológicos e bioquímicos quando avaliou a toxicidade aguda da Riparina A.

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados pelo teste in vivo, seguindo o protocolo da OECD, permitem concluir que a riparina B caracteriza-se como uma molécula de baixa toxicidade, sugerindo seu uso de forma segura como uma substância ativa, detentora de diversas atividades farmacológicas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. J. F. et al. Pathophysiological investigations, anxiolytic effects and interaction of a semisynthetic riparin with benzodiazepine receptors. **Biomed. Pharmacother.** v.103, p.973-981, 2018.
- ARAÚJO, E. J. F. et al. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of inclusion complexes between Riparin A and b-cyclodextrin. **Journal Molecular Estructure**, v. 1142, n. 1, p. 84-91, 2017.
- CASTELO-BRANCO, U. V. et al. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of Aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmaceutica Bonarense**, v. 19, p. 197-202, 2000.
- CHAVES, R. C. et al. Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. Pharmacology, **Biochemistry and Behavior**, v. 180, p. 44-51, 2019.
- LOPES, I. S. et al. Riparin II ameliorates corticosterone-induced depressive-like behavior in mice: Role of antioxidant and neurotrophic mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 33-42, 2018.
- MAFUD, A. C. et al. Antiparasitic, structural, pharmacokinetic, and toxicological properties of riparin derivatives. **Toxicology in vitro**, v. 50, p. 1-10, 2018.
- NUNES, G. B. L. et al. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Sciences**, v. 121, p. 57-64, 2015.
- NUNES, G. B. et al. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparinderived compounds. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4595-4607, 2014.