



AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL DA FARINHA DE LICHIA EM RATAS WISTAR

EVALUATION OF ACUTE ORAL TOXICITY CAUSED BY LYCHEE FLOUR IN FEMALE WISTAR RATS

Célia Cristiana Araújo Garcia⁽¹⁾

¹ Bacharel em Ciências de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus de Rio Paranaíba.

José Antonio de Souza Cruz Ramos⁽²⁾

² Técnico em Vigilância Epidemiológica de Animais, Rio Paranaíba, Minas Gerais.

Thalita Riquelme Augusto⁽³⁾

³ Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.

Virgínia Souza Santos⁽⁴⁾

⁴ Nutricionista. Professora Assistente da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus de Rio Paranaíba.

Martha Elisa Ferreira de Almeida⁽⁵⁾

⁴ Nutricionista. Professora Adjunta da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus de Rio Paranaíba.

Endereço para correspondência: Martha Elisa Ferreira de Almeida, Caixa Postal 22, Sala 223, Prédio da Biblioteca,

Campus Universitário, CEP: 38810-000, Rio Paranaíba, MG. Telefone: (34) 3855-9325.

E-mail: martha.almeida@ufv.br.

RESUMO

A necessidade de alimentos saudáveis a um baixo preço é crescente, principalmente para o controle do excesso de peso, que é uma epidemia mundial. A lichia é uma fruta considerada como um alimento funcional, pois combate e previne a obesidade. Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade oral aguda da farinha de lichia em ratas Wistar. Para o preparo da farinha sanitizou-se as lichias, e suas frações (casca, polpa e semente) foram desidratadas a 55 °C. As ratas foram divididas em três grupos: grupo controle (C) que recebeu, via gavagem, apenas água mineral, e nos demais grupos (F300 e F2000) este procedimento foi realizado com leite semidesnatado adicionado da farinha de lichia (casca, polpa e semente) nas doses de 300 e 2000 mg·kg⁻¹ de peso corporal. Realizou-se a análise toxicológica, mediante um *screening* toxicológico, e dos dados morfométricos (peso corporal e dos órgãos). Os dados morfométricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis a uma significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto os parâmetros morfométricos avaliados. Nenhuma rata veio a óbito e nem apresentou intoxicação aguda proveniente da farinha. Concluiu-se que a farinha das três frações desta fruta não apresentou toxicidade oral aguda em ratas, e estava apta para ser avaliada em estudos com seres humanos.

Palavras-Chave: ensaio toxicológico; *Litchi chinensis*; parâmetros morfométricos.

ABSTRACT

The need for healthy food at a low price is increasing, especially for the control of overweight, which is a worldwide epidermis. The lychee is considered a functional food to combat and prevent obesity. This study aimed to evaluate the acute oral toxicity of lychee meal in Wistar rats. To prepare the lychee flour the fruits was sanitized and separated in peel, pulp and seed afterward dehydrated at 55 °C. The rats was separated in three groups: control (C) which was treated only with mineral water by gavage; and the groups (F300 and F2000) were treated with semi-skimmed milk added to lychee flour (peel, pulp and seed) at the rates 300 and 2000 mg·kg⁻¹ based on body weight. The toxicological analysis was realized based on a toxicology screening and morphometric results (body and organ weight). The morphometric results were analyzed by Kruskal-Wallis test at 5%. There was no statistical difference between the groups regarding the evaluated morphometric parameters. None rat died and no had acute intoxication. It was possible to conclude that the lychee flour in the studied concentrations didn't show acute oral toxicity in rats and may be assessed in human studies.

Keywords: toxicological testing; *Litchi chinensis*; morphometric parameters.

INTRODUÇÃO

As frutas geralmente são ricas em flavonoides, polifenóis, resveratrol, quercetinas, catequinas, isoflavonas e ácidos fenólicos, que ingeridos diariamente tem um alto poder anti-inflamatório do tecido adiposo, propiciando uma redução da obesidade e suas doenças associadas (1,2).

A lichia (*Litchi chinensis* Sonn), que é uma espécie do gênero *Litchi* e da família Sapindaceae, por ser uma fruta com um alto teor de antioxidantes apresenta vários benefícios à saúde humana. Ela é uma fruta considerada funcional devido aos seus compostos bioativos e anti-inflamatórios, que combate e previne a obesidade e suas comorbidades associadas. Seus polifenóis na forma de oligômeros e monômeros de catequinas e proantocianidinas exercem efeitos diretos sobre a síndrome metabólica, prevenindo o diabetes *mellitus*, reduzindo as reservas de gordura e combatendo o envelhecimento (1,3).

O pericarpo da lichia tem concentrações elevadas de compostos fenólicos (51 a 102 g·kg⁻¹ de matéria seca) que modulam a proliferação celular, neutralizam os radicais livres e regulam a atividade de algumas enzimas. A oxidação lipídica é um dos principais fatores que causam a deterioração dos alimentos durante o processamento e o armazenamento, porém os compostos fenólicos têm a capacidades de reduzir esta oxidação (4).

O extrato aquoso da flor da lichia diminuiu os teores de lipídios séricos de ratos, sendo sugerido o seu efeito antiobesidade ao inibir as enzimas do metabolismo lipídico como a lipase pancreática e a lipase lipoproteica (5).

A vitamina C presente nesta fruta (cerca de 50 mg·100 g⁻¹) atua como antioxidante neutralizando os radicais livres que propiciam o estresse oxidativo na obesidade, a carcinogênese, o envelhecimento precoce e a peroxidação lipídica que promove as doenças cardiovasculares (6).

Por ser uma fruta rica em fibras, seus consumidores poderão ter vários benefícios tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças (obesidade, diabetes *mellitus*,

câncer de cólon-retal e as dislipidemias) e da constipação intestinal (7).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade oral aguda da farinha de lichia (casca, polpa e sementes) em ratas Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa do tipo quali-quantitativa e experimental foi realizada *in vivo* após a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), protocolo nº 18/2014.

Preparo da farinha de lichia

Adquiriu-se as lichias da variedade "Bengal" via doação, de um produtor do Município de São Gotardo (MG). Após o transporte para o Laboratório Centro Vocacional Tecnológico (CVT) de Rio Paranaíba (MG), elas foram higienizadas com água corrente para retirar as sujidades visíveis e posterior sanitização com cloro ativo a 200 ppm/10 minutos (8), e uma nova imersão em água corrente durante 2 minutos. Na sequência, colocou-as para escorrer e posteriormente sofreram a separação manual da casca, polpa e semente. Triturou-se as sementes em multiprocessador para facilitar sua desidratação na estufa com circulação de ar. As cascas e as sementes permaneceram durante 65 horas na estufa e a polpa por 196 horas, até que ambas obtivessem um peso constante.

Após a secagem das frações isoladamente a 55 °C, estas foram trituradas em liquidificador doméstico e peneiradas para a obtenção de uma farinha de menor granulometria. Armazenou-se separadamente as farinhas das três partes da fruta a temperatura ambiente em frasco âmbar até a realização das análises toxicológicas.

Na Figura 1 podem ser observadas as etapas de preparo da lichia para a produção da farinha de suas frações.



Figura 1. Etapas do preparo da farinha das partes da lichia.

Legenda: A- lichia *in natura*; B- primeira lavagem com água corrente para a retirada das sujidades; C- sanitização com água clorada (200 ppm) e água de enxague; D- separação da casca; E- separação das sementes; F- sementes trituradas para facilitar a secagem; G- separação da polpa; H- casca desidratada e sua farinha; I- farinha da semente; J- polpa desidratada; K- polpa desidratada sendo peneirada após sua trituração em moinho de facas; L- farinha de lichia na sequência apresentada da esquerda para a direita (polpa, semente e casca).

Ensaio biológico com ratas Wistar

Após 21 dias de aleitamento materno, separou-se as ratas de suas mães e dos irmãos machos. As nove ratas fêmeas nulíparas (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) utilizadas no estudo, com um peso médio inicial de $149,02 \pm 3,13$ g, adquiridas no Laboratório de Nutrição Experimental da Universidade Federal de Viçosa, Campus de Rio Paranaíba, foram divididas aleatoriamente em três grupos (C, F300 e F2000). Elas foram mantidas em gaiolas individuais, temperatura de 21 °C, ciclo de claro e escuro (12 horas), e recebimento *ad*

libitum de água e ração comercial (Biobase® - ração comercial para ratos e camundongos).

Para tanto, foram utilizados três animais em cada grupo, conforme sugerido na Diretriz 423 (9). Nos ensaios convencionais de DL50, as fêmeas são mais sensíveis aos testes de toxicidade aguda, pois apresentam uma capacidade de desintoxicação mais baixa que os machos (9).

O grupo controle (C) recebeu, via gavagem, apenas água mineral, e nos demais grupos este procedimento foi realizado com leite semidesnatado

adicionado da farinha de lichia (casca, polpa e semente) nas doses de 300 e 2000 mg·kg⁻¹ de peso corporal, conforme o protocolo proposto pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (9). Utilizou-se a farinha dissolvida no leite, uma vez que tal estudo foi realizado para avaliar a toxicidade oral aguda da farinha que seria utilizada posteriormente em outro estudo com crianças, sendo esta uma condição determinada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos (CEP) da Universidade Federal de Viçosa que aprovou o projeto nº 506.155 sobre a utilização da farinha de lichia no leite semidesnatado por crianças.

Para o preparo da solução utilizada na gavagem para os grupos F300 e F2000 misturou-se 1,67 g de cada farinha de lichia (casca, polpa e semente) em 100 mL de leite semidesnatado. Após a homogeneização, calculou-se com base no seu peso corporal a quantidade exata que deveria ser administrada em cada animal. Utilizou-se o anestésico Lidial (Cloridrato de Xilocaína) na agulha de gavagem para evitar desconforto

durante o procedimento, no qual a agulha era curva e possuía uma ponta-bola.

A toxicidade oral aguda foi determinada por meio do Guia OECD-423/2001 “Toxicidade Aguda de Classe” (9) que determina as doses a serem analisadas de 5; 50; 300 ou 2000 mg·kg⁻¹ de peso corporal (10). Optou-se por testar as duas maiores dosagens, para que estudos posteriores com esta farinha fossem realizados com humanos.

As ratas permaneceram em jejum durante 12 horas para o cálculo do volume a ser ingerido por cada animal na dose única via gavagem. O consumo de água e de ração só foi liberado 2 horas após a gavagem. Depois deste procedimento, observou-se cada animal de acordo com o *screening* toxicológico nos tempos de 5 minutos, 30 minutos, 1 hora e 24 horas. Após tal período, monitorou-se os animais diariamente durante 14 dias (11) quanto aos sinais de toxicidade (Quadro 1), conforme o procedimento descrito por Sachetti (10).

Quadro 1. Ficha de *screening* toxicológico utilizado nas ratas Wistar. Rio Paranaíba, MG, 2014.

Número do animal e seu grupo	Item avaliado	5 minutos	30 minutos	1 hora	24 horas	2 ^o dia	Demais dias ...	14 ^o dia
	Irritabilidade ao ser tocada							
	Vocalização ao ser contida							
	Posição lateral							
	Automutilação							
	Permanência no canto da gaiola							
	Lacrimejamento							
	Cromodacriorreia							
	Salivação							
	Micção ao ser contida							
	Defecação ao ser contida							
	Piloereção							
	Diarreia							
	Hemorragia vaginal							
	Cianose							
	Morte							

Nos casos em que o evento foi ausente atribuiu-se a pontuação zero ao valor “normal” e considerou-se a escala de 0 a 4 correspondendo, respectivamente a: ausente, raro, pouco, moderado e intenso. Quando o evento foi inicialmente presente (micção e defecação ao ser contida), atribuiu-se a pontuação quatro ao valor “normal” e considerou-se a escala de 0 a 8 correspondendo, respectivamente a: ausente, raro, pouco, diminuído, presente (normal), aumentado, moderado, elevado e intenso.

No 14^o dia as ratas foram anesthesiadas com Propofol, na dosagem de 10 mL·kg⁻¹ de peso corporal do animal, conforme descrito na Resolução Normativa

nº 13 de 20 de setembro de 2013 (12). Em seguida foram sacrificadas pela introdução de uma agulha com um ângulo de 45° à esquerda do tronco do animal, no qual foi coletado cerca de 4 mL de sangue através da punção cardíaca, o que levou ao óbito por exsanguinação, conforme descrito no artigo 15 da Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (13) e na Resolução nº 301 do Conselho Federal de Biologia-CFBio, artigo 8, parágrafo 2 (14).

Após a retirada por necropsia dos órgãos (coração, fígado, baço e rins), estes foram pesados, sendo que o fígado foi avaliado macroscopicamente quanto à sua coloração (10), conforme a seguinte classificação: vermelho, vermelho claro (róseo) e vermelho escuro.

Análise estatística

Os dados morfométricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis a uma significância de 5%, no Programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 20.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais que receberam a farinha de lichia (grupos F300 e F2000) não apresentaram nenhuma reação toxicológica e não morreram durante os 14 dias de avaliação. A diarreia foi verificada apenas na rata F300₂ (animal número 2) no 10º dia do experimento.

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto o tamanho dos órgãos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão do peso inicial e final, ganho de peso corporal e dos órgãos de ratas Wistar. Rio Paranaíba, MG, 2014.

Parâmetro analisado (g)	Grupos			Valor de p
	C	F300	F2000	
Peso inicial	149,58±1,61	148,46±3,74	149,02±4,65	0,957
Peso final	189,07±3,95	182,00±9,82	188,85±6,51	0,670
Ganho de peso	39,49±1,67	33,54±10,71	39,83±2,40	0,733
Coração	0,73±0,11	0,67±0,03	0,65±0,08	0,525
Fígado	9,27±0,16	8,89±1,10	8,94±0,76	0,790
Baço	0,83±0,51	0,48±0,01	0,76±0,22	0,277
Rins	1,52±0,00	1,42±0,13	1,47±0,06	0,707

Não houve diferença pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância entre os grupos (na linha) para nenhum dos parâmetros analisados.

A partir da classificação macroscópica do fígado foi possível identificar que os animais do mesmo grupo apresentavam colorações diferentes, conforme demonstrado na Figura 2, evidenciando que a farinha de lichia não teve influência sobre tal parâmetro. Pucci et al. (15) ao avaliarem ratos e camundongos

tratados com o extrato etanólico bruto das folhas de bugre (*Rudgea viburnoides*) nas doses de 2000 e 5000 mg·kg⁻¹ não identificaram nenhuma alteração macroscópica após a necropsia dos órgãos avaliados.

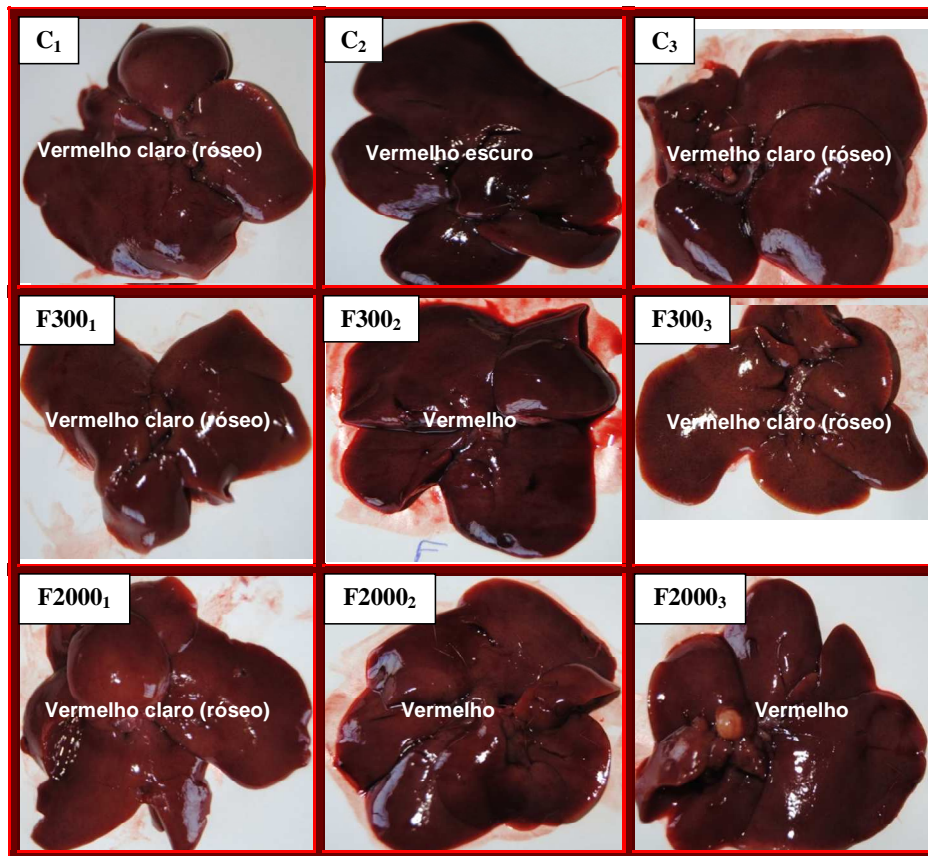


Figura 2. Análise macroscópica do fígado das ratas ressaltando suas diferentes colorações. Rio Paranaíba, MG, 2014.

A farinha de lichia foi classificada na classe 5 (substância com DL50 superior a $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e menor que $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), sendo considerada de baixa toxicidade. Sachetti et al. (16) não observaram sinais clínicos de toxicidade entre os animais que receberam o óleo-resina de copaíba, assim como Pucci et al. (15), que não identificaram sinais de toxicidade e morte nos ratos e camundongos tratados com o extrato etanólico bruto das folhas de bugre (*Rudgea viburnoides*) nas doses de 2000 e $5000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Porém, Gonçalves (17), ao analisar o extrato aquoso de esporão de galo (*Celtis iguanaea*) na dose de $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ observou sinais de cardiotoxicidade e nefrotoxicidade dos ratos e camundongos machos mediante o aumento de peso do coração e dos rins. Nas doses de 70; 200 e $600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ o extrato do esporão de galo não apresentou nenhuma toxicidade no coração, fígado, baço, rins e pulmões, sendo enquadrado na classe 5 de toxicidade.

Inexistem estudos sobre a toxicidade da lichia em modelos animais. Entretanto, já foram associados alguns casos de toxicidade em humanos após a colheita ou o consumo da lichia (18). Paureau et al. (19) sugeriram uma associação entre os surtos de encefalite aguda em crianças no Norte do Vietnã e a colheita de lichia. Godoy et al (20) destacaram que os distúrbios cerebrais ocorridos em Bangladesh e na Índia podem ser resultantes da ingestão da fitotoxina da lichia denominada α -(metilenociclopropil)glicina, enquanto outros autores (21-22) sugerem que a neurotoxicidade deste fruto se deve ao homólogo do L-aminoácido hipoglicina, uma vez que a ingestão de Ackee, uma fruta Jamaicana parente da lichia (23), rica em hipoglicina promove a encefalopatia tóxica em crianças desnutridas.

A farinha de lichia foi considerada de baixa toxicidade em ratos Wistar, e pode ser uma alternativa na alimentação

humana, especialmente para o tratamento da obesidade.

CONCLUSÃO

Não houve mortalidade e sinais de toxicidade nas ratas Wistar nas doses

REFERÊNCIAS

(1) CHANG, Y-Y.; et al. Antioxidative and anti-inflammatory effects of polyphenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)-flower-water-extract on livers of high-fat-diet fed hamsters. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n.1, p. 44-52, 2013.

(2) SIRIWARDHANA, N.; et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 613-623, 2013.

(3) IDEAL. **Lichial**. 2012. Disponível em: <<http://www.farmabin.com.br/files/Lichial.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

(4) WANG, H-C.; et al. Phenolic compounds and the antioxidant activities in litchi pericarp: difference among cultivars. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 4, p. 784-789, 2011.

(5) LI, W.; et al. Phenolic profiles and antioxidant activity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp from different commercially available cultivars. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14954-14967, 2012.

(6) LIRA, F. A. S.; et al. Influência da vitamina C na modulação autonômica cardíaca no repouso e durante o exercício isométrico em crianças obesas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 12, n. 3, p. 259-267, 2012.

(7) SICHIERI, R.; et al. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, p. 227-232, 2000.

testadas de 300 e 2000 mg·kg⁻¹, bem como diferença estatística entre os grupos quanto os parâmetros morfométricos avaliados. Concluiu-se que a farinha das três frações desta fruta foi classificada com baixa toxicidade, pois não apresentou efeitos tóxicos em ratas, apresentando-se apta para ser usada em estudos com seres humanos.

(8) HOJO, E. T. D. **Aplicação de métodos combinados na conservação da qualidade de Lichias 'Bengal'**. 2010. 120 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Campus Jaboticabal, São Paulo, 2010.

(9) ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420**. Acute oral toxicity-fixed dose procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

(10) SACHETTI, C. G. **Avaliação toxicológica do óleo-resina de copaiba em ratos: estudos de toxicidade aguda, neurotoxicidade e embriofetotoxicidade**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

(11) LUCIO, E. M. R.; et al. Avaliação toxicológica aguda e *screening* hipocrático da episopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9-10, n. 1, p. 23-35, 2000.

(12) BRASIL. Resolução nº 13, de 20 de setembro de 2013. Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, sessão 187, 26 set. 2013.

(13) BRASIL. Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 – CFMV. Procedimentos e

métodos de eutanásia em animais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 maio 2012.

(14) BRASIL. Resolução nº 301, de 8 de dezembro de 2012. Procedimentos de captura, contenção, marcação, soltura e coleta de animais vertebrados *in situ* e *ex situ*. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, sessão 1, 28 dez. 2012.

(15) PUCCI, L. L.; et al. Avaliação da toxicidade aguda oral e da atividade diurética da *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. (congonha-de-bugre). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n.1, p. 30-37, 2010.

(16) SACHETTI, C. G.; et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.

(17) GONÇALVES, N. Z. **Avaliação da toxicidade oral aguda e atividade diurética de *Celtis iguanaea* (jacq.) Sargent.** 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

(18) SPENCER, P. S.; PALMER, V. S.; MAZUMDER, R. Probable toxic cause for suspected lychee-linked viral encephalitis.

Emerging Infectious Diseases, v. 21, n. 5, p. 904-905, 2015.

(19) PAIREAU, J.; et al. Litchi-associated acute encephalitis in children, Northern Vietnam, 2004-2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1817-1824, 2012.

(20) GODOY, D.; et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2068-2079, 2003.

(21) McDOWELL, F.; VARNEY, P. L. Melioidosis, report of first case from the Western Hemisphere. **Journal of the American Medical Association**, v. 134, n. 4, p. 361-362, 1947.

(22) DOKER, T. J.; et al. Contact investigation of melioidosis cases reveals regional endemicity in Puerto Rico. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 2, p. 243-250, 2015.

(23) INGLIS, T. J.; ROLIM, D. B.; SOUSA, A. Q. Melioidosis in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 5, p. 947-954, 2006.

Enviado: 14/01/2015

Revisado: 06/01/2016

Aceito: 03/03/2016