

# Ensaio pré-clínicos em ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, constituinte isolado de *Platonia insignis*

## *Pre clinical trials in rats treated with 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1) constituent isolated from Platonia insignis*

Chistiane Mendes Feitosa<sup>1,3</sup>; Patricia Régia Pereira dos Santos<sup>2</sup>; Rivelilson Mendes de Freitas<sup>3</sup>; Aldenora Maria Ximenes Rodrigues<sup>4</sup>; Guilherme Antônio Lopes de Oliveira<sup>5</sup>; Joaquim Soares da Costa Júnior<sup>6</sup>, Antonio do Nascimento Cavalcante<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Produtividade do CNPq, docente dos programas de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Química da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Teresina, PI - Brasil.

<sup>2</sup>Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Teresina-Piauí, Brasil.

<sup>3</sup>*In memoriam*. Bolsista de Produtividade do CNPq, docente dos programas de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Rede Nordeste de Biotecnologia-Ponto focal – RENORBIO da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Teresina, PI - Brasil.

<sup>4</sup>Mestranda do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí - UFPI. Teresina, PI - Brasil.

<sup>5</sup>Doutorando do programa Rede Nordeste de Biotecnologia-Ponto focal – RENORBIO da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Teresina, PI - Brasil.

<sup>6</sup>Professor Doutor do Instituto Federal de Ciência, Educação e Tecnologia do Piauí - IFPI. Teresina - PI, Brasil.

<sup>7</sup>Doutorando do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Piauí -UFPI. Teresina, PI - Brasil.

### Autor para correspondência:

Chistiane Mendes Feitosa  
Universidade Federal do Piauí. Campus  
Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga,  
64049-550 - Teresina, PI [Brasil]  
Chistiane@ufpi.edu.br

### Resumo

**Introdução:** Avaliou-se a toxicidade aguda de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1), composto obtido de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro), após administração oral em ratos Wistar. **Métodos:** A toxicidade aguda foi analisada através dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. A análise de citotoxicidade *in vitro* foi feita pelo método do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT). Os tecidos cerebrais e hepáticos foram avaliados histopatologicamente. **Resultados:** O tratamento agudo com TG1 (dose de 30 mg kg<sup>-1</sup>) não produziu alterações hematológicas e histopatológicas nas áreas cerebrais e hepáticas. A redução dos níveis das enzimas transaminase (AST) e fosfatase alcalina (ALKP) pode sugerir proteção hepática. As análises bioquímicas da aspartato aminotransferase, ALKP e do ácido úrico apresentaram seus níveis reduzidos, conferindo preservação dos rins e fígado dos animais (p<0,05). TG1 não revelou potencial citotóxico pelo método MTT. **Conclusão:** O tratamento com TG1 não produz alterações hematológicas, bioquímicas, histopatológicas cerebrais e hepáticas em ratos o que caracteriza uma baixa toxicidade.

**Descritores:** Bioquímica; Toxicidade aguda; *Platonia insignis*; Fitoterapia.

### Abstract

**Introduction:** The aim of this study was to assess the acute toxicity of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1), a compound isolated from *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro). **Methods:** The acute toxicity was analyzed by biochemical and hematological parameters. The cytotoxic study was conducted by the MTT method. The histopathological study was conducted in brain and liver tissues. **Results:** Acute treatment with TG1 (dose of 30 mg. kg<sup>-1</sup>) did not change the general behavior pattern of rats and not result in hematological and histological changes in the liver. The reduced levels of transaminase and alkaline phosphatase (ALKP) enzymes may suggest even certain liver protection. The biochemical analyzes demonstrated low levels of aspartate aminotransferase, ALKP and uric acid, providing preservation of kidneys and livers of animals (p<0.05). TG1 this study did not reveal cytotoxic potential by MTT method. **Conclusion:** These results indicate that treatment with TG1 not produce hematological, biochemical and histopathological alterations in rats suggesting low toxicity.

**Key words:** Biochemistry; Acute toxicity; *Platonia insignis*; Phytotherapy.

## Introdução

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes tem sido meta de grandes estudos, uma vez que comprovando-se ações farmacológicas por meio de testes pré-clínicos com animais, muitas dessas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais<sup>1-3</sup>.

Em estudos preliminares importantes pesquisas foram divulgadas sugerindo que a banha do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) apresentou excelente ação cicatrizante *in vivo*<sup>1,2</sup>, esta ação foi atribuída a ácidos presentes nesta banha, que é extraída das sementes do fruto desta espécie. Em pesquisas recentes uma formulação farmacêutica semisólida foi desenvolvida para avaliar a ação cicatrizante *in vivo*, nesta formulação utilizou-se o composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) (Figura 1) e os resultados foram bastante promissores<sup>2</sup>.

O composto TG1, um triglicerídeo isolado da banha do bacuri é, um derivado da trioleína e solúvel em solventes apolares<sup>3,4</sup>. A trioleína constitui em um triacilglicerol que pode ser obtida da espécie *Persicae semen* (Rosaceae), apontada como promissora na terapêutica antitrombótica<sup>5,6</sup>.

Diante desse potencial farmacológico e da necessidade da realização da avaliação toxicológica de espécies vegetais é de grande interesse científico e comercial a determinação da toxicidade da trioleína em ensaios pré-clínicos, uma vez que os resultados obtidos podem servir ao conhecimento e desenvolvimento de um fitoterápico a partir do triacilglicerol TG1, isolado de uma espécie vegetal amplamente utilizada pela população de nosso Estado com finalidade terapêutica e alimentícia. A Anvisa publicou o Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos (RE N° 90)<sup>7</sup>. E nesse estudo foram seguidos os padrões estabelecidos por esse guia para a avaliação da toxicidade aguda do triacilglicerol TG1.

Após revisão da literatura foi verificado que não há disponíveis análises toxicológicas sobre o composto TG1, justificando a necessidade e a importância da realização do presente estudo. Diante disso, é importante um estudo mais detalhado sobre as propriedades toxicológicas dessa espécie, bem como de compostos obtidos a partir de análise fitoquímica.

Neste contexto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como realizar análises histopatológicas em áreas cerebrais como hipocampo, corpo estriado e tecido hepático de ratos adultos tratados por via oral com 1,3-distearoil-2-oleoilglicerol (TG1) e analisar a citotoxicidade *in vitro* deste composto em 2 linhagens de células tumorais. Além disso, durante o ensaio pré-clínico também foram avaliados os parâmetros comportamentais em ratos adultos para melhor avaliar sua segurança e corroborar com os resultados divulgados.

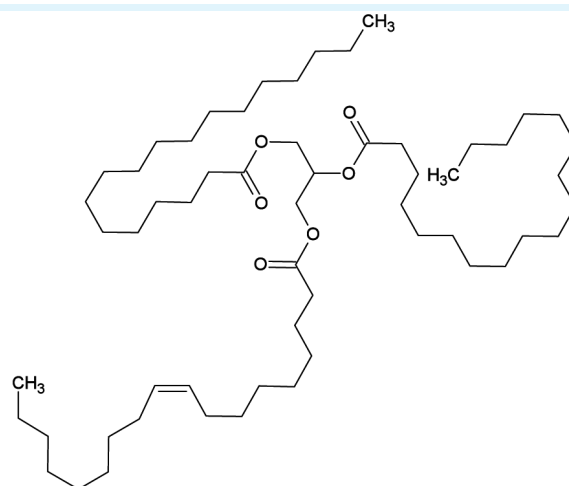


Figura 1: Estrutura química do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

## Metodologia

### Animais

Foram utilizados, por experimento, Ratos Wistar machos adultos com peso variando entre 200 a 250 g de 2 meses de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Os animais

receberam água e dieta (Purina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 2$  °C). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (n° 004/2012).

## Determinação estrutural do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

O composto em estudo foi isolado da balsa das sementes do bacuri, sendo identificado como um triglicerídeo derivado da trioleína. TG1 apresenta fórmula molecular:  $C_{57}H_{108}O_6$ , identificado por técnicas espectroscópicas de RMN H e C13 e espectros bidimensionais.

## Células e metodologia para determinação da citotoxicidade *in vitro*

As linhagens tumorais utilizadas, NCIH (carcinoma de pulmão - humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humano) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O TG1 foi diluído em DMSO puro estéril e testado na concentração de 25 µg/mL. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT descrito inicialmente por Mosman<sup>8</sup>, este método verifica a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas.

As células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL. O TG1 previamente dissolvido em DMSO foi diluído em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionado em placa de 96 poços (100µL/poço). As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em seguida, fo-

ram adicionados 25 mL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

## Determinação dos Parâmetros comportamentais em Ratos

No protocolo experimental da triagem farmacológica comportamental, foram utilizados dois grupos de 10 ratos. Esse protocolo visa avaliar o comportamento dos animais frente à administração de substâncias isoladas de espécies vegetais e/ou sintéticas. Foram estabelecidos alguns critérios comparativos para uma série de comportamentos, que na sua maioria são exibidos normalmente pelos animais. Dessa forma foi verificada a presença ou não de determinadas alterações comportamentais em decorrência do tratamento, possivelmente está relacionada ou não a atividade sobre o sistema nervoso central de roedores. Essa triagem inicial do composto estudado viabiliza a realização de testes mais específicos<sup>9-10</sup>.

O grupo controle foi tratado via oral com solução de Tween 80 a 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (veículo; n=10) durante 30 dias consecutivos. E no segundo grupo, os animais os animais foram tratados com TG1 na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> emulsionado no veículo durante 30 dias consecutivos. 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 30 dias para observação dos parâmetros comportamentais, segundo teste hipocrático descrito na literatura<sup>11</sup>.

## Estudo da toxicidade aguda em parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos tratados com do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

Nesse protocolo experimental, dois grupos de dez ratos foram tratados da seguinte forma: o primeiro grupo foi tratado por via oral com TG1

na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> em veículo durante 30 dias consecutivos. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9%) durante 30 dias consecutivos.

Após 30 dias do tratamento agudo, os animais foram anestesiados com 0,3 mL de pentobarbital sódico (40 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.) e em seguida foi feita a coleta de sangue por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro<sup>12</sup>. O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo, um com anticoagulante HB (Laborlab<sup>®</sup>) 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 a saber: glicose, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina (ALKP), bilirrubinas total e direta e ácido úrico. Os ensaios foram realizados em aparelho automatizado Vitros 250 com sistemas comerciais da Johnson & Johnson<sup>®</sup>.

A contagem de eritrócitos, leucócitos totais, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta por meio do analisador automático de células hematológicas Advia 120/*hematology* (Siemens).

### Avaliação histopatológica em cérebros e tecido hepático e ratos tratados com do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

Dois grupos de seis ratos foram tratados da seguinte forma: o primeiro grupo foi tratado por via oral com TG1 na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> dissolvido em veículo (Tween 80 0,05% em solução fisiológica 0,9%) durante 30 dias consecutivos. O grupo controle foi tratado apenas com o veículo pelo mesmo período.

Após 30 dias de tratamento, todos os animais foram eutanasiados por anestesia com pentobarbital sódico (50 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Os cérebros e fígados foram coletados e fixados em formalina a 4% por 24 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 4 mm, coradas em hematoxilina - eosina (H & E), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As regiões cerebrais e hepáticas foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos e Watson (1986)<sup>13</sup>. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo, corpo estriado e fígado analisados de acordo com o método descrito na literatura<sup>14,15</sup>.

### 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  $p < 0,05$ .

### Análise da citotoxicidade *in vitro*

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos desvio no programa GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em duplicata. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

## Resultados

### Determinação estrutural de TG1

**1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).** O composto em estudo foi isolado da banha das se-



mentos do bacuri, sendo identificado como um triglicerídeo derivado da trioleína. TG1 apresenta fórmula molecular:  $C_{57}H_{108}O_6$ , identificado por técnicas espectroscópicas de RMN H e C13 e espectros bidimensionais a saber: NMR  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR, DEPT 135 COSY e HMBC  $C_{57}H_{108}O_6$ , RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , ppm, 125 MHz):  $\delta_H$  = 5.45-5.35 (4H, m,  $-CH-CH-$ ), 5.30-5.28 (1H, m,  $-CH_2-CH-CH_2-$ ), 4.34-4.30 (2H, dd,  $-CH_2-CH(O)-CH_2-$ ), 4.19-4.15 (2H, dd,  $-CH_2-CH(O)-CH_2-$ ), 2.35-2.31 (6H, t,  $-C(=O)-CH_2-CH_2-$ ), 2.04-1.96 (4H, m,  $=CH_2-CH_2-$ ), 1.65-1.62 (6H, m,  $-C(=O)-CH_2-CH_2-$ ), 1.32-1.29 (nH, m,  $-CH_2-$ ), 0.92-0.89 (9H, t,  $-CH_3$ ). NMR spectra description of  $^{13}C$  is  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , ppm, 500 MHz),  $\delta_C$  = 173.31 (C-1, sn 1,3); 172.87 (C-1, sn 2); 34.06 (C-2, sn 1,3); 34.21 (C-2, sn 2); 24.88 (C-3, sn 1,3); 24.88 (C-3, sn 2); 29.22 (C-4, sn 1,3); 29.14 (C-4, sn 2); 29.50 (C-5, sn 1,3); 29.50 (C-5, sn 2); 29.35 (C-6, sn 1,3); 29.35 (C-6, sn 2); 29.70 (C-7, sn 1,3); 29.70 (C-7, sn 2); 29.72 (C-8, sn 1,3); 29.72 (C-8, sn 2); 29.72 (C-9, sn 1,3); 129.69 (C-9, sn 2); 29.72 (C-10, sn 1,3); 130.03 (C-10, sn 2); 29.72 (C-11, sn 1,3); 29.72 (C-11, sn 2); 29.72 (C-12, sn 1,3); 29.72 (C-12, sn 2); 29.38 (C-13, sn 1,3); 29.38 (C-13, sn 2); 31.94 (C-14, sn 1,3); 31.94 (C-14, sn 2); 22.71 (C-15, sn 1,3); 22.71 (C-15, sn 2); 31.94 (C-16); 22.71 (C-17); 14.13 (C-18); 68.88 (C-2', CHO); 62.10 (C-1' e d 3',  $CH_2O$ )<sup>2</sup>.

### Determinação da citotoxicidade in vitro do TG1

O 1,3-distearoil-2-oleoilglycerol (TG1) apresentou um percentual de inibição de 16% com erro de 1,4 para a linhagem de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) e para a linhagem NCI H2N2 (Carcinoma de pulmão humano) inibição de 12,6 com erro de 1,3. De acordo com a escala de intensidade para avaliação do potencial citotóxico, esses valores o caracterizam como uma substância sem atividade citotóxica. Esses achados sugerem inicialmente segurança no seu uso. No entanto, estudos complementares com outras linhagens celulares são necessários para reforçar estas análises.

### Determinação dos parâmetros comportamentais em ratos pelo método do Screening Hipocrático

O composto TG1 não alterou o peso corpóreo dos animais durante os 30 dias de observação. Não houve alteração no consumo de água e ração dos animais durante os 30 dias de observação. Dentre os sinais clínicos sugestivos de toxicidade, o único observado foi piloereção e nenhuma morte foi registrada para a dose administrada de 30 mg  $kg^{-1}$  durante os dos 30 dias consecutivos de tratamento. Aspectos quanto ao estado de consciência e disposição, coordenação motora, tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central e autônomo foram preservados. De forma geral, o composto TG1 não produziu efeitos tóxicos mais severos em outros parâmetros comportamentais observados durante 30 dias, sugerindo que o TG1 pode ser usado de forma segura, uma vez que demonstrou baixa toxicidade durante o ensaio pré-clínico.

### Resultados das análises dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

O tratamento dos animais com a dose de 30 mg  $kg^{-1}$  (v.o) com TG1 alterou apenas o HCM e CHCM nos parâmetros hematológicos, em comparação com o grupo controle (Tabela 1). Os demais parâmetros analisados permaneceram dentro dos valores de referência e não demonstram importância clínica. Estes índices por serem produto de cálculos, provavelmente estão mais suscetíveis a variações analíticas

A tabela 2 apresenta os valores obtidos da avaliação dos parâmetros bioquímicos em ratos submetidos aos ensaios toxicológicos, por via oral com TGI durante 30 dias. Nesse grupo foram verificadas alterações nas análises para o ácido úrico, AST, bilirrubina total e direta, fosta-tase alcalina em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) na dose testada. Os valores de ácido úrico, triglicerídeos, AST e fosfatase alcalina dos ratos tratados com o TG1, diminuíram em

**Tabela 1: Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos**

Parâmetros	Controle (n=10)	TG1 (n=10)
Hemácias (mm <sup>3</sup> )	7,71 ± 0,19	7,51 ± 0,20
Hemoglobina (g dL <sup>-1</sup> )	12,60 ± 0,27	13,01 ± 0,72
Hematócrito (%)	41,21 ± 0,94	39,96 ± 0,79
VCM (fL)	53,70 ± 0,81	54,49 ± 0,95
HCM (pg)	16,44 ± 0,35	18,01 ± 0,69*
CHCM (g dL <sup>-3</sup> )	30,62 ± 0,26	34,09 ± 0,85*
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	585,3 ± 79,87	552,9 ± 27,8

Legenda: Parâmetros hematológicos obtidos de ratos wistar machos tratados de forma aguda por via oral com veículo Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (Controle, n = 10 por grupo) e com TG1 na dose 30 mg kg<sup>-1</sup> e observados durante 30 dias. Os valores representam a média ± 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-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

relação aos valores desses analitos quando comparados aos obtidos entre os animais do grupo controle. A bilirrubina total e direta aumentaram de forma significativa em comparação com o grupo controle. Por outro lado, foi visto um aumento no nível de ALT, embora essa alteração não tenha sido significativa. Ao passo que os analitos como a glicose, ureia, creatinina e colesterol total não sofreram alteração em comparação aos valores de referência.

### Resultados das análises histopatológicas em ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) durante 30 dias consecutivos

A figura 2 apresenta as alterações histopatológicas no tecido hepático de ratos adultos. Nesse experimento, os animais tratados com TG1 (30 mg kg<sup>-1</sup>) e com veículo tiveram o tecido hepático analisado. Na análise histopatológica do fígado pode ser verificado um efeito vascular importante e presente em todos os fragmentos avaliados. Esse efeito pode ser descrito por uma

**Tabela 2: Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos**

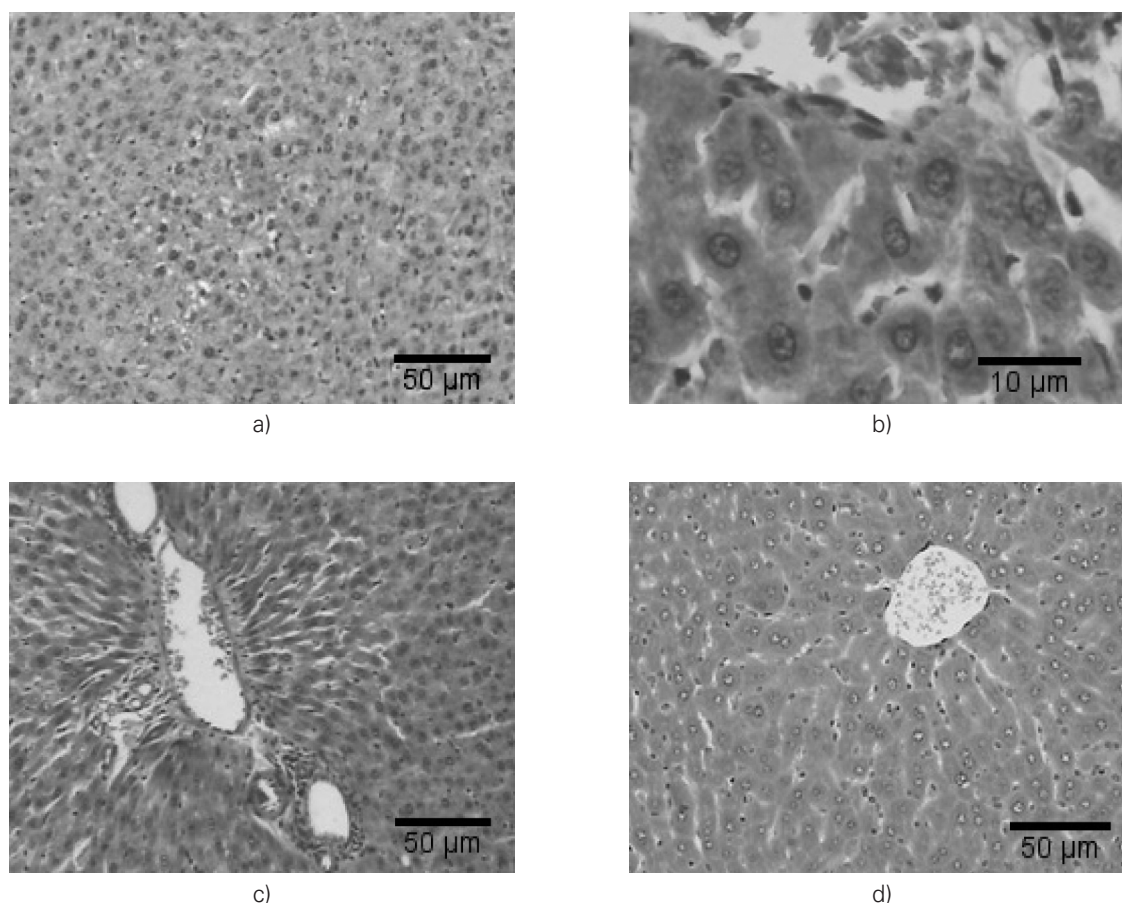
Parâmetros	Controle (n=10)	TG1 (n=10)
Glicose (mg dL <sup>-1</sup> )	149,50 ± 8,92	141,5 ± 5,42
Ureia (mg dL <sup>-1</sup> )	45,70 ± 1,55	47,14 ± 1,27
Creatinina (mg dL <sup>-1</sup> )	0,51 ± 0,06	0,41 ± 0,03
Ácido úrico (mg dL <sup>-1</sup> )	9,06 ± 0,55	1,04 ± 0,18*
Triglicérides (mg dL <sup>-1</sup> )	71,1 ± 11,08	59,4 ± 8,23
CT (mg dL <sup>-1</sup> )	75,60 ± 8,64	77,17 ± 9,21
AST (U mL <sup>-1</sup> )	256,20 ± 16,96	151,5 ± 14,63*
ALT (U mL <sup>-1</sup> )	77,00 ± 1,35	95,0 ± 10,76
Fosfatase alcalina (U L <sup>-1</sup> )	625,8 ± 27,21	232,1 ± 21,23*
Bilirrubina total (mg dL <sup>-1</sup> )	0,39 ± 0,06	0,80 ± 0,03*
Bilirrubina direta (mg dL <sup>-1</sup> )	0,14 ± 0,02	0,32 ± 0,01*

Legenda: Parâmetros bioquímicos obtidos de ratos wistar machos tratados de forma aguda por via oral com veículo Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (Controle, n = 10 por grupo) e com TG1 na dose 30 mg kg<sup>-1</sup> e observados por 24 horas. Os valores representam a média ± 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-Neuman-Keuls como *post hoc* teste).

intensa congestão vascular (provavelmente por aumento da pressão), bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas. No geral, a arquitetura do fígado foi detectada de forma preservada. Além disso, observa-se uma discreta poliploidia nas células hepáticas, que é comum em um órgão como o fígado, que possui enorme capacidade de regeneração. Já o grupo tratado com veículo não apresentou nenhuma alteração histológica.

A figura 3 mostra o estudo histopatológico no corpo estriado de ratos adultos. Nesse estudo não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado dos ratos tratados com TG1 e veículo durante 30 dias com doses repetidas.

Na figura 4 demonstramos as análises histopatológicas no hipocampo de ratos adul-



**Figura 2: Avaliação histopatológica do efeito do tratamento durante 30 dias com TG1 e veículo no tecido hepático de ratos adultos.**

Legenda: A, B e C - Alterações histopatológicas no fígado de ratos adultos tratados com TG1 durante 30 dias consecutivos. Observado um efeito vascular importante representado por uma intensa congestão vascular, bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas (seta preta): Hematoxilina - Eosina (H & E) 40X e 100X respectivamente; D - Ausência de alterações histopatológicas no fígado de ratos adultos tratados com veículo durante 30 dias consecutivos, Imagens analisadas em ImageJ2.

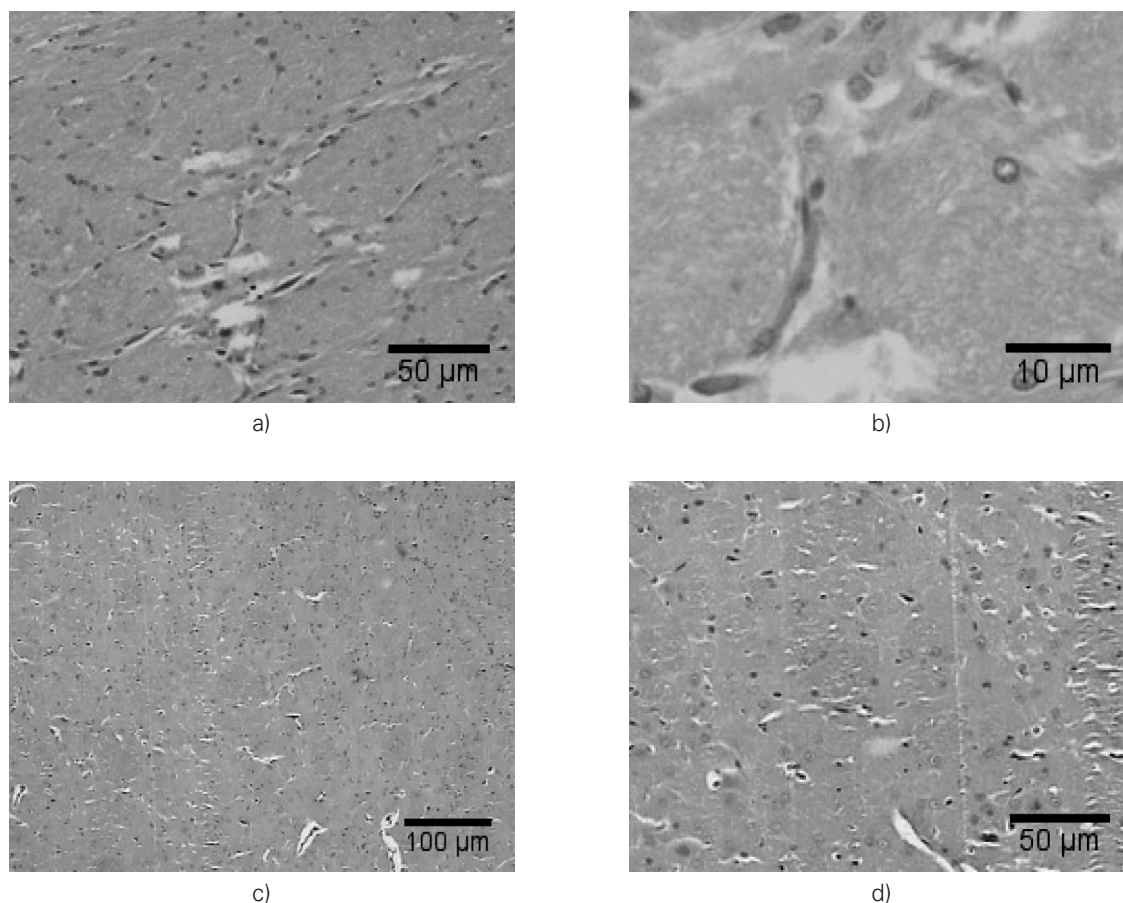
tos. Nesse estudo foi verificado apenas no hipocampo algumas células com núcleos picnóticos. Além disso, não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado.

## Discussão

O Estudo da citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de screening do National Cancer Institute dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano <sup>16</sup>. É um método rápido, sensível e barato. Este método tem a capacidade de analisar

a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Esse estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação <sup>17</sup>. Os resultados do TG1 neste estudo, confrontam com os efeitos moderadamente citotóxicos revelados nos estudos frente à *Artemia salina leach* do extrato hexânico (EH), do qual foi isolado o composto TG1. Já a fração acetato de etila do extrato etanólico das

**Figura 3: Avaliação do efeito do tratamento com TG1 e veículo no corpo estriado de ratos adultos**



Legenda: A e B - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos tratados com TG1. C e D - Ausência de Alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos tratados com veículo, Hematoxilina - Eosina (H & E) 40 e 100X, respectivamente; Imagens analisadas em ImageJ2.

sementes do bacurí apresentou efeitos moderadamente citotóxicos e a fração diclorometano fortemente citotóxica. Além disso, os extratos e as frações de *P. insignis* apresentaram-se genotóxicos aos fibroblastos pulmonares de hamster chinês (cél.V79)<sup>4</sup>. Nos nossos estudos, o composto TG1 fora testado de forma pura, sugere-se que haja um sinergismo nestas frações, potencializando o efeito citotóxico do composto. Além disso, é visto que algumas das linhagens celulares utilizadas no teste de citotoxicidade do TG1 não são as mesmas utilizadas para as frações.

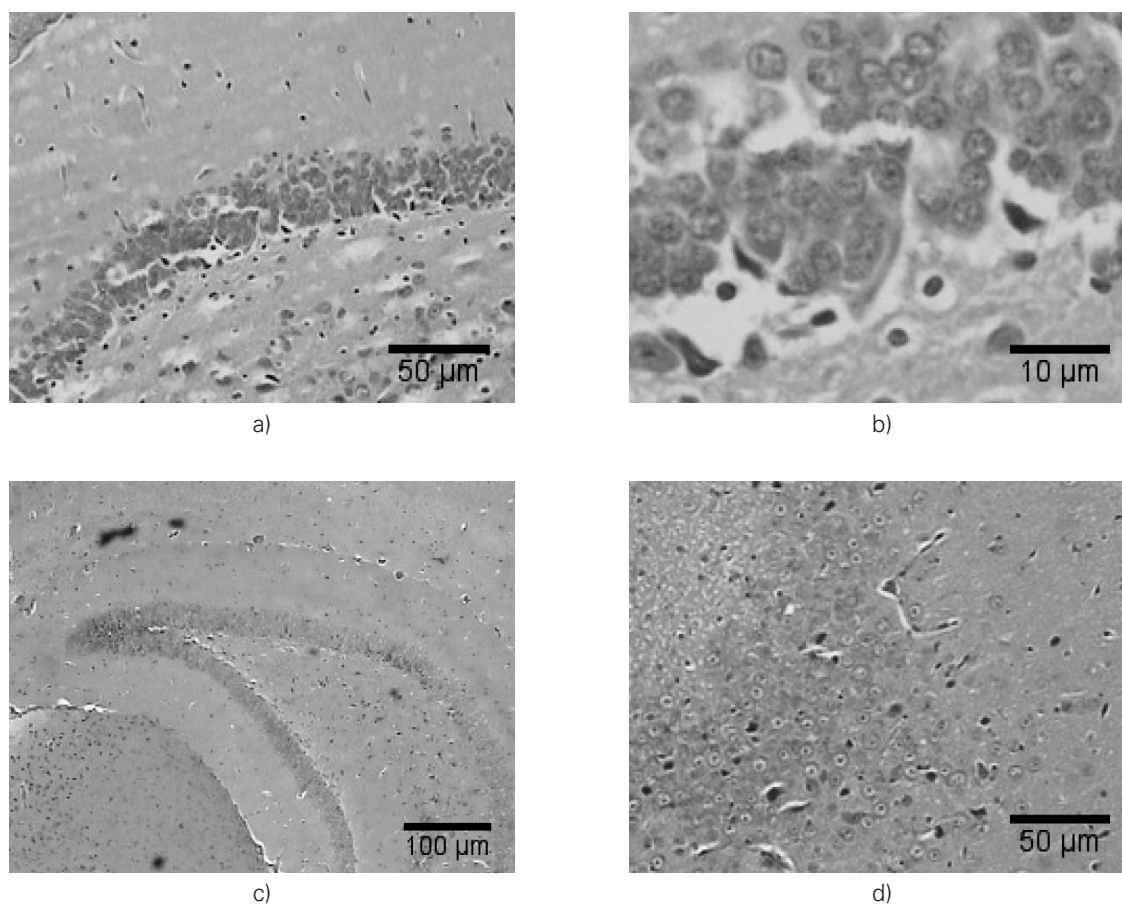
A piloereção pode ser um indicativo clínico sugestivo de toxicidade, e foi o único sinal observado durante a administração via oral de forma aguda com TG1. A preservação das ati-

vidades motora e do sistema nervoso central observadas nesse estudo com administração oral de TG1 divergiu dos resultados encontrados com a fração acetato de etila, derivada do bacuri, após administração intraperitoneal em roedores, que exerceu efeitos estimuladores sobre a atividade locomotora e o sistema nervoso central. Outros estudos sugerem que o aumento sobre a atividade locomotora pode ser explicado pela ausência de efeito relaxante muscular nervoso periférico<sup>18</sup>.

Complementando esses dados encontrados durante o período de observação, os animais não perderam massa corporal, e não houve alteração no consumo de ração e água. Esse dado pode reforçar inicialmente a hipótese de que o



Figura 4: Avaliação do efeito do tratamento com TG1 e veículo no hipocampo de ratos adultos.



Legenda: A e B - Alterações histopatológicas no hipocampo de ratos tratados com TG1, nessa lâmina podem ser observadas células com núcleos picnóticos (seta preta – figura B). C e D- Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos tratados com veículo. Hematoxilina - Eosina (H & E) 40 e 100X, respectivamente; Imagens analisadas em ImageJ2.

TG1 pode ser usado de forma segura na indústria farmacêutica e alimentícia, uma vez que o fruto do bacurí é usado regularmente pela população do estado do Piauí e outras regiões do Nordeste brasileiro com essas duas finalidades. A literatura demonstra que a massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância isolada de espécies vegetais e/ou não. Portanto, o monitoramento de espécies vegetais e de compostos isolados dessa espécie é importante durante as pesquisas farmacológicas e toxicológicas como forma de ampliar as informações quanto a segurança e eficácia<sup>19</sup>.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos podem sofrer alterações devido a vários fa-

tores, dentre eles, a linhagem e a cepa de uma dada espécie, bem como em função do método de coleta de sangue. Assim, é fundamental determinar os valores de referência para animais de diferentes biotérios de acordo com a espécie, a dieta, a linhagem, o sexo e a faixa etária. Os roedores têm sido os animais mais utilizados pelos centros de pesquisa, uma vez que constituem o grupo de animais disparadamente mais utilizados para estudos científicos em diversas áreas, por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhantes à dos humanos<sup>20</sup>.

Os níveis de glicose no sangue fornecem dados sobre a homeostase geral desse carboidrato no sangue. A ureia resulta do metabolismo proteico, o seu nível sanguíneo, bem como o nível

da creatinina pode ser característico de insuficiência renal e, portanto, podem ser usados como marcadores em diagnóstico<sup>21</sup>. Teoricamente, a creatinina é mais indicada como marcador da função renal, uma vez que a quantidade presente nos rins é mais constante, além de não ser reabsorvida nos túbulos renais como a ureia<sup>22</sup>. Nesse estudo a ureia e a creatinina não tiveram seus níveis aumentados, sugerindo que o TG1 pode ser administrado de forma aguda sem produzir sobrecarga da função renal em roedores. A insuficiência renal, naturalmente acarreta acúmulo de ureia, creatinina e ácido úrico<sup>21</sup>. A redução dos valores plasmáticos de ácido úrico e ureia, sugerem uma melhora da performance renal<sup>23</sup>. Diante desses dados, sugere-se que não houve comprometimento da função renal, embora mais ensaios sobre a toxicidade subcrônica e crônica sejam necessários para consolidar esse achado.

Os principais componentes lipídicos do sangue são o colesterol, triglicérides e os fosfolipídeos. Suas determinações são cada vez mais comuns entre os médicos e leigos, no intuito de avaliar o risco de doenças cardíacas<sup>21</sup>. Os adipócitos correspondem às células do tecido adiposo, encontrado sob a pele, nas glândulas mamárias e cavidade abdominal. Essas células respondem pela estocagem de triglicérides que serve como combustível para as reações metabólicas no organismo<sup>24</sup>. Nas células musculares também podem ser encontrados grandes depósitos de triglicérides<sup>25</sup>. Um dos fatores de risco mais enfatizados nas doenças cardiovasculares, é o aumento de triglicérides. A redução do seu nível é de grande necessidade e urgência para o tratamento dessas doenças<sup>26</sup>. Com relação aos níveis séricos dos triglicérides não foi detectada alteração significativa nos animais tratados com TG1, embora tenha sido visto uma diminuição sem importância clínica já que os valores permaneceram dentro dos valores de referência.

O fígado é o órgão central do metabolismo no organismo<sup>21</sup>, é comum pesquisar a atividade das enzimas hepáticas em clínica de pequenos animais, para detectar anormalidades na atividade dessas enzimas, uma vez que são conside-

radas marcadores sensíveis de alterações hepatobiliares. As patologias que acometem o fígado acabam por alterar o perfil das enzimas hepáticas elevando seus valores séricos, e essas mudanças podem ser induzidas por agentes exógenos químicos, como por exemplo, um fármaco<sup>27</sup>

As enzimas transaminases (ALT e AST) e fosfatase alcalina são de grande importância como marcadores de lesões nas células hepáticas<sup>28</sup>. A fosfatase alcalina é a enzima mais frequentemente associada à obstrução do ducto biliar<sup>21</sup> e as transaminases estão amplamente distribuídas nos tecidos, sendo que a AST predomina no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, ao passo que a ALT predomina no fígado, rim e coração. As transaminases são consideradas indicadores sensíveis de dano hepatocelular<sup>14,29</sup>. A administração aguda do TG1 provocou uma diminuição significativa da AST e ALKP. Sugerindo certa preservação do tecido hepático, ou seja, um possível efeito hepatoprotetor. No entanto, esses achados precisam ser mais investigados. A ALT não sofreu nenhuma alteração de interesse clínico. Um estudo recente aponta que a AST, pode apresentar-se mais elevada, possivelmente pela influência da anestesia e estresse muscular aos quais os ratos são submetidos para a coleta de sangue<sup>30</sup>.

A fosfatase alcalina (ALKP) é uma enzima fosfohidrolase, presente em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. 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<sup>31</sup>. Essa enzima pode ter seu aumento associado aos distúrbios intestinais<sup>23</sup>.

A bilirrubina é um pigmento tetrapirrólico. Aproximadamente 70 a 80% resulta do metabolismo da hemoglobina (Hb) de hemácias senescentes ( $\leq 300$  mg/dia); uma outra fração, 20 a 30% são derivadas das células eritróides da medula prematuramente e de hematoproteínas de outros locais do organismo (principalmente fígado). As hemácias ao sofrerem metabolismo

nas células reticuloendoteliais (RE) originam a bilirrubina. Esta é transportada ao fígado ligada à albumina, para ser conjugada com ácido glucurônico e transportada aos canalículos biliares e, em seguida, ao duodeno. No intestino, a bilirrubina é hidrolisada a bilirrubina não conjugada e reduzida a urobilinogênios por bactérias e aproximadamente 80 a 90% são excretadas nas fezes inalteradas ou oxidadas. Uma fração bem pequena, menos de 3 mg/dL são filtradas 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 devido ao uso de medicamentos<sup>32</sup>. Nesse estudo observou-se uma elevação tanto da bilirrubina total, quanto da direta, após o tratamento com TG1. Como esse aumento não foi acompanhado nenhuma elevação dos níveis da AST, já que pode ser considerada como um importante marcador de toxicidade hepática. Dessa forma, os resultados encontrados não indicam que essa alteração pode ser uma manifestação toxicológica, mas apenas uma variação fisiológica.

Estudos apontam que os parâmetros hematológicos dos ratos da linhagem Wistar podem ser semelhantes aos dos humanos, com exceção da quantidade de hemácias e de plaquetas. Os ratos possuem uma quantidade maior destes dois parâmetros hematológicos, o que confere maior viscosidade ao sangue e rápida coagulação. Assim os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) que são calculados a partir das hemácias, hemoglobina e hematócrito sofrem também uma pequena alteração quando comparados aos valores de referência para humanos<sup>30,32</sup>

Estudos anteriores mostraram que a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas envolve várias alterações em nível neuroquímico e histológico em regiões cerebrais que precisam ser investigadas, por meio da administração de compostos naturais, buscando um possível efeito neuroprotetor<sup>33-35</sup>. Em estudo recente, o composto garcinielliptona FC (GFC) isolado a partir de sementes do bacurizeiro, apresentou

resultados promissores, quanto a possíveis efeitos antioxidantes em hipocampo de ratos<sup>36</sup>. O hipocampo é uma das áreas cerebrais mais suscetíveis ao estresse oxidativo<sup>37</sup>. O fígado tem um papel importante no equilíbrio homeostático dos processos biológicos, uma vez que regula as funções metabólicas envolvidas com a síntese, armazenamento e o catabolismo de substâncias químicas endógena e exógena. A peroxidação lipídica contribui para o desenvolvimento de processos isquêmicos e uma série de outros eventos patológicos causadores de lesão hepática<sup>30</sup>.

Nos estudos histopatológicos foram observadas apenas no hipocampo algumas células com núcleos picnóticos. E não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado. Dessa forma, o uso do TG1 não causou alterações às áreas cerebrais estudadas, revelando segurança quanto ao seu uso. Na análise histopatológica do fígado pode ser verificado um efeito vascular importante e presente em todos os fragmentos avaliados. Este efeito pode ser descrito por uma intensa congestão vascular (provavelmente por aumento da pressão), bem como pelas discretas áreas de esteatose em microgotas. No geral, a arquitetura do fígado foi detectada de forma preservada. Além disso, foi observada a presença de uma discreta poliploidia nas células hepáticas, que é comum em um órgão como o fígado, que possui enorme capacidade de regeneração sugerindo, assim, que não houve nenhum grau de comprometimento desses órgãos. Mas esses achados devem ser reforçados com estudos em um período de tratamento subcrônico e crônico em doses repetidas.

## Conclusões

Esses resultados indicam que o tratamento agudo com - TG1 na dose de 30 mg kg<sup>-1</sup> não alterou de forma geral o padrão comportamental dos ratos, e não produziu alterações hematológicas, e histopatológicas nas áreas cerebrais e hepáticas analisadas. A redução dos níveis da AST e ALKP pode sugerir até mesmo certa pro-



teção hepática, que deverá ser melhor investigada em modelos animais de hepatotoxicidade. O aumento da bilirrubina total e direta não chega a caracterizar uma toxicidade, provavelmente apenas uma alteração fisiológica. Tanto as áreas cerebrais, como o fígado foram mantidas de forma preservadas durante o tratamento. TG1 não apresentou atividade citotóxica *in vitro* pelo método MTT. Diante disso, a continuação dos estudos com essa substância, apontam para um possível agente terapêutico no tratamento de doenças inflamatórias e particularmente as neurodegenerativas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq por financiamento de projetos e bolsas concedidas.

## Referências

- Santos Júnior RQ, Soares LC, Maia Filho ALM, Araujo KS, Santos IMSP, Costa Júnior JS, et al. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). *CnSaúde*. 2010; 9(4): 575-581.
- Mendes MCS ; Oliveira GAL ; Lacerda JS ; Rezende Junior LM ; Silva MLG; Coelho ML. et al. Evaluation of the cicatrizant activity of a semisolid pharmaceutical formulation obtained from *Platonia insignis* Mart. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2015; 9 (6): 154-165.
- Santos PRP; Carvalho R BF ; Costa Júnior JS ; Freitas RM ; Feitosa CM. Survey of physicochemical and pharmacological properties of extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. a perspective for developing phytomedicines. *Braz J Pharm*. 2013; 94:161-168.
- Costa Júnior JS, Ferraz ABF, Sousa TO, Silva R AC, Lima SG, Feitosa CM, et al. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. *Seed. Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013;112: 34 –41.
- Chaves DSA; Costa SS; Almeida AP; Frattani F; Assafim M; Zingali BR. Metabólitos Secundários de origem vegetal: Uma Fonte Potencial de Fármacos Antitrombóticos. *Quím Nova*. 2010; 33: 172-180.
- Messias JM; Da Costa BZ; De Lima VMG; Giese EC.; Dekkers RFH. Barbosa AM. Lipases Microbianas: Produção, Propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. 2011; 32 ( 2): 213-234.
- Craveiro A.C.S.; Carvalho DMM; Nunes RS; Fakhouri R; Rodrigues SA; Silva FT .Toxicidade aguda do Extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18 : 739-743.
- Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*. 1983; 65, 55-63.
- Almeida RN; Falcão ACGM; Diniz RST; Quintans-Júnior LJ; Polari RM; Barbosa-Filho JM et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Rev Bras farmacog Revista Brasileira de Farmacognosia*. 1999; 80: 72-76.
- Omena MLRA. Ensaio Etnofarmacológico de Espécies vegetais com ação no sistema nervoso central, originárias do bioma Caatinga. *Saúde & Amb. Rev*. 2007, 2 ( 2): 92-107.
- Malone MH; Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*. 1961, 25: 320-332.
- Waynforth BH. Injection techniques. In: *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*. London: Academic Press, 1980.
- Paxinos G; Watson C. The brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1986.
- 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*. 2001; 83:209-217.
- 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 plantas med. Aromát*. 2011, 9 (6): 440-445.



16. Skehan P; Storeng R; Scudiero D; Monks A; McMahon J; Vistica D; et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82: 1107-1112.
17. Berridge MV; Tan AS; McCoy KD; Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 1994, 4, 14-19.
18. Da Costa Júnior JS; de Almeida AA; Costa JP; das Graças Lopes Citó M; Saffi J; de Freitas RM. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. *Pharm Biol.* 2012; 50 (4): 453–457.
19. Jahn AI; Gunzel 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: 171-178.
20. Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Sci Plena.* 2012; 8 (4): 1-6.
21. Sacher RA, McPherson RA. *Widmann Interpretação Clínica dos exames Laboratoriais.* 11ª edição. São Paulo. Manole, 2002; 445p.
22. Steven LS; Scott MS. Urinary sistem. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology.* Iowa: Iowa State, 2002; p. 277-336.
23. Dantas JA; Ambiel CR; Cuan 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: 165-170.
24. Lehninger AL; Nelson DL; COX, M.M. *Principles of Biochemistry.* 4ª. ed. New York: Freeman and Company, 2005; 119 p.
25. Champe PC; Harvey R. *Bioquímica ilustrada.* 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 446p, 2000.
26. Austin MA; Hokanson JE; Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol.* 1998; 81: 7-12.
27. Sharon A; Center DMV. Avaliação fitoquímica da função hepática no cão e gato. In: *Atualização terapêutica veterinária: pequenos animais.* 1995; p. 1166-1183.
28. Martin DW; Mayes PA; Rodwell YW. In: *HARPER'S Review of Biochemistry.* Califórnia: Lange Medical, 1981; 688p.
29. Miller O, Gonçalves RR. *Laboratório para o clínico.* 8.ed. São Paulo: Editora Arheneu, 1999; 607p.
30. Belo MAA; Soares VE; Souza LM; Sobreira MR; Cassol DMS; Toma SB. Hepatoprotective treatment attenuates oxidative damages induced by carbon tetrachloride in rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2012; 64 (3):155-165.
31. Wright PJ, Plummer DT. The use of urinary enzyme measurement of direct renal damage caused by nephrotoxic compound. *Biochemical Pharmacology.* 1974, 23: 65-73.
32. Wallach JB. *Interpretação de Exames laboratoriais.* 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009; 1465p.
33. Barros DO; Xavier SM; Barbosa CO; Silva RF; Maia FD; Oliveira AA; et al. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 2007; 416:227-230.
34. Freitas RM; Dejiang Feng D; Jordan J. Neuropharmacological effects of lipoic acid and ubiquinone on  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011, 25: 211-216.
35. 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: 76-79.
36. Siqueira IR; Fochesatto C; Andrade A. Santos M; Hagen M; Klein-Bello A; et al. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2005; 23: 663–671.
37. Júnior JS, de Almeida AA, Tomé A da R, Citó AM, Saffi J, de Freitas RM. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. (Bacuri) on epilepsy models. *Epilepsy Behav.* 22 .2011: 678–684.