

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA “Prof. Delby Medeiros”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

SAULO RIOS MARIZ

ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO
DE *Jatropha gossypifolia* L.

João Pessoa - PB

2007

SAULO RIOS MARIZ

ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO DE *Jatropha gossypifolia* L.

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz

João Pessoa - PB

2007

M34e Mariz, Saulo Rios.

Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L. / Saulo Rios Mariz. - João Pessoa, 2007.

186p.:il.

Orientadores: Isac Almeida de Medeiros, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz.

Tese (doutorado) – UFPB/CCS

1. Toxicologia. 2. Plantas tóxicas. 3. *Jatropha gossypifolia* L. 4. Pião-Roxo.

UFPB/BC CDU: 615.9(043)

SAULO RIOS MARIZ

ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO DE *Jatropha gossypifolia* L.

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Aprovada em ____/____/____

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPB)
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPB)
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Departamento de Fisiologia e Patologia (UFPB)
(Examinador)

Prof. Dr. Antonio Carlos Romão Borges
Departamento de Ciências Fisiológicas (UFMA)
(Examinador)

Prof^a. Dr^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro
Escola de Enfermagem e Farmácia (UFAL)
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus criador e senhor da minha vida. Aquele que, encarnado em Cristo, demonstra que somente o amor pode transformar conhecimento e inteligência em sabedoria.

À Josilene Pinheiro Mariz, expressão maior desse amor sábio de Deus em minha vida.

Aos meus pais Emílio Feitosa Mariz e Mariovilma Rios Mariz pela educação oferecida, principalmente, pelo exemplo de vida. Também aos meus irmãos, sogros, cunhados, sobrinhos e demais familiares. Privar-me do vosso convívio me possibilita, mesmo sofrendo, experimentar vez por outra, o prazer do pássaro que retorna ao ninho após alçar vôos vitais.

Ao Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros pela competente e segura orientação, fundamentais para a realização desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, pela colaboração e simpatia que transformaram laços consangüíneos distantes em amizade e admiração.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho pelo fornecimento de material bibliográfico.

Aos Professores Doutores: Bagnólia Araújo da Silva e Luiz (ito) Dias Rodrigues, pelo exemplo de constante inquietude e auto-avaliação quanto ao exercício da docência.

À Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Agra pela identificação botânica da espécie.

À Prof^a. Dr^a. Maria Salete Trigueiro de Araújo pelos esclarecimentos sobre os exames histopatológicos.

Aos Professores Doutores: Reinaldo Almeida; Diego Guedes e Liana Moraes, pelas correções e sugestões realizadas durante o exame de qualificação.

Aos colegas de pós-graduação. Em especial, a Gilberto Santos Cerqueira pelos momentos de lutas e sonhos compartilhados bem como pelas enriquecedoras

discussões; Arquimedes de Melo pelas preciosas sugestões e a Maurus Holanda, pela amizade.

Às colegas Hosana Bandeira dos Santos e Kardilândia Oliveira, pelo grande auxílio com os exames laboratoriais.

Aos funcionários do LTF/UFPB por suas contribuições específicas e fundamentais ao presente estudo. Em especial a José Crispim Duarte, no tratamento dos animais; Raimundo Nonato Filho, na preparação do extrato e triagem fitoquímica; Dulce de Oliveira, na preparação da exsicata e ao agrônomo Fernando Viana pelas orientações na secagem do material vegetal.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Ensaios Toxicológicos pela colaboração ativa em vários experimentos. Em especial: Washington Araújo, Thayse Palomaro, Nélon Barbosa, Jadson Dantas e Josué Ramalho.

Aos professores do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Em especial: Maria Esther Valois, colega de disciplina; Luiz Mário Silveira, amigo desde a graduação; Maria Nilce Ribeiro, Flávia Amaral e Denise Coutinho, coordenadora e companheiras de projeto (respectivamente) no Programa de Qualificação Interinstitucional que me possibilitou este doutorado. Ao professor do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFMA, Antonio Carlos R. Borges, pela sugestão e bibliografia preliminar da espécie vegetal objeto deste estudo.

À Fernanda Farias do Curso de Biblioteconomia da UFPB, pela normatização da tese.

À UFMA, pela concessão da licença, com vencimento, para realização do doutorado.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) que, através do PQI, financiou grande parte desta pesquisa.

Aos demais que contribuíram para a realização deste trabalho.

“Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda a Ciência;... se não tiver amor, nada serei”.

(I Coríntios 13:2. Bíblia Sagrada).

RESUMO

A espécie *Jatropha gossypifolia* L. (*Euphorbiaceae*), também denominada pião-roxo, é uma planta reconhecidamente tóxica. Todavia, alguns dos vários usos dessa planta na medicina popular têm sido comprovados por estudos experimentais, dentre os quais se destaca a recente demonstração do seu efeito hipotensor. Com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico anti-hipertensivo, a partir da referida espécie, este trabalho se propôs a avaliar a toxicidade pré-clínica (aguda e crônica) do extrato etanólico (EE) de partes aéreas (folhas e caules) de *Jatropha gossypifolia* L. de acordo com a norma brasileira (ANVISA-RE 90/2004). No estudo toxicológico agudo, ratos Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) foram tratados (v.o.) com o produto (n = 6 por dose e sexo) em doses de até 5 g/kg de peso corpóreo. Durante 14 dias após o tratamento foram observados: sinais tóxicos gerais, letalidade, evolução ponderal, consumo de água e alimentos. Após esse período, os animais sobreviventes foram sacrificados para análise de parâmetros sangüíneos e histopatológicos. No estudo crônico os animais foram tratados com doses de 45 mg/kg, 135 mg/kg e 405 mg/kg durante 13 semanas (n = 10 por dose e sexo). Durante o tratamento, além dos parâmetros já citados, avaliou-se temperatura corporal, glicemia caudal e alterações comportamentais (Campo Aberto e *Rota Rod*). Ao final do tratamento, 40% dos animais de cada grupo foram sacrificados para análise dos parâmetros já citados no estudo agudo. No tratamento agudo apenas nos animais tratados com dose igual ou superior a 1,8 g/kg (v.o.) observou-se sinais de redução da atividade do SNC e distúrbios gastrintestinais. Em machos das doses de 4,0 e 5,0 g/kg (v.o.), a perda gradativa de peso e a paralisia do trem posterior foram sinais anteriores ao óbito. Somente em machos sobreviventes à dose de 5 g/kg (v.o.) o extrato reduziu o consumo de alimentos de modo significativo. Essa dose também reduziu a evolução ponderal de fêmeas sem alterar a ingestão de alimentos desses animais. Alterações laboratoriais e histopatológicas só ocorreram em machos tratados com a maior dose sugerindo hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, além de leucopenia e agravo pulmonar. A dose letal mediana (DL₅₀) foi estimada entre 4,0 e 5,0 g/kg para machos e foi superior a 5 g/kg em fêmeas. Esses resultados indicam uma toxicidade aguda oral relativamente baixa considerando que as alterações só ocorreram em altas doses. No estudo crônico confirmou-se a depressão do SNC e distúrbios gastrintestinais observados no agudo. A letalidade foi de 46,6% entre os machos da maior dose experimental (405 mg/kg v.o.) e de 13,3 % tanto entre fêmeas da maior dose quanto entre os animais tratados com 135 mg/kg (v.o.) do produto. O extrato reduziu a evolução ponderal de machos da dose de 405 mg/kg (v.o.). A temperatura colônica foi inicialmente elevada e posteriormente reduzida de modo não proporcional à dose e em ambos os sexos. O produto apresentou efeito hiperglicemiante reversível (ausente no grupo satélite) em alguns animais. A atividade motora foi reduzida em fêmeas da maior dose. A elevação de proteínas totais em machos da maior dose foi clinicamente discreta e reversível. Ocorreu importante hiperglicemia entre machos da menor dose. Encontrou-se anemia leve em machos tratados com 405 mg/kg (v.o.) e aumento de plaquetas em fêmeas satélites (135mg/Kg). A análise histopatológica também corrobora a hepatotoxicidade, toxicidade renal e apresenta danos pulmonares. Esses resultados demonstram a elevada toxicidade crônica do produto e nos permitem sugerir refinamento químico do extrato com posterior avaliação da manutenção do efeito hipotensor e eventual toxicidade.

Palavras-chave: Toxicologia. Plantas Tóxicas. *Jatropha gossypifolia* L. Pião-roxo.

ABSTRACT

The *Jatropha gossypifolia* L.(*Euphorbiaceae*), also known in Brazil as “pião-roxo”, is a plant with high toxicity. However, some of its therapeutic uses have been proved by experimental studies including a recent paper about the hypotensive effect of this plant. In order to contribute to the development of a herbal drug from this species, this work presents a toxicity assessment in rats with the ethanolic extract (EE) from aerial parts of *Jatropha gossypifolia* L. according to Brazilian law (ANVISA-RE 90/2004). In the acute toxicity test we treated Wistar rats (*Ratus norvegicus albinus*) with the EE in doses of up to 5 g/kg body weight (p.o.). Each group was observed, for 14 days after the treatment, in points such as toxicity signs, lethality, body weight gain and food and water consumption. After this period, the animals which survived were killed for biochemical, hematological and histopathologic analysis. In the chronic toxicity assessment, the rats were handed out on three experimental groups (45 mg/kg, 135 mg/kg and 405 mg/kg). Each group (n=10 per gender and dose) was dosed daily by gavage for a period of 13 weeks. During the treatment, in addition to the parameters cited above, body temperature, tail glucose level and changes in behavior were analyzed (Open field and Rota Rod). At the end of treatment, 40% of animals from each group were killed for the analysis of those parameters already cited in the acute study. The acute treatment shows that only doses equal or higher than 1.8 g/kg body weight (p.o.) cause signals of toxicity as neurological depression and digestive disorders. We observed weight loss and a hind limb paralysis in males (doses 4 and 5 g/kg p.o.). Only in males that survived to higher dose treatment (5 g/kg p.o.) the extract reduced the food intake significantly. This dose also promotes weight loss in females without reduction of food intake. In males treated with 5 g/kg (p.o.), some biochemical, hematological and histopathologic alterations suggest important acute toxicity in the liver, the kidney, the blood and the lung. The LD50 was between 4 and 5 g/kg (p.o.) to males and was higher than 5 g/kg (p.o.) to females. These results indicate that acute toxicity from EE is not significant because the alterations happened just in high doses. However, the neurological depression and digestive disorders were confirmed by chronic evaluation. The lethality among males was 46.6 % (405 mg/kg p.o.), 13,3% (135 mg/kg p.o.) and among females was 13.3 % (doses of 135 mg/kg and 405 mg/kg p.o.). The EE reduces the body weight gain (males 405 mg/kg p.o.). At the colon temperature the extract produces alterations that were not related to the doses in both sexes. In some rats, the product increased glucose level in a reversible way. The locomotion was reduced in females (405 mg/kg p.o.). The increase of total proteins (males 405 mg/kg p.o.) was discrete. It was observed an important increase of glucose level among males (45 mg/Kg p.o.). We also found a discrete anaemia in males (405 mg/kg p.o.) and a increased level of platelet in females of satellite group (135mg/Kg). The histopathologic analysis confirmed the toxicity in liver, kidney and lung. These data show the high chronic toxicity from the product. We propose a chemical refinement on the ethanolic extract to get new fractions with a better risk/benefit relation.

Key words: Toxicology. Toxic Plants. *Jatropha gossypifolia* L. Pião-roxo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem das partes aéreas de um exemplar de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	34
Figura 2	Fórmula estrutural da jatrofona, principal constituinte químico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L (MATOS, 2004).....	36
Figura 3	Fluxograma do Teste da Dose Fixa.....	60
Figura 4	Imagem de ratos agrupados em gaiola de polietileno.....	71
Figura 5	Imagem de ratos sob o experimento de <i>Rota Rod</i>	85
Figura 6	Tecido hepático com arquitetura lobular e veia hepática terminal (VHT) de paredes finas, em rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X250).....	99
Figura 7	Congestão venular em veia hepática terminal (VHT) acompanhada de dilatação e congestão sinusoidais (DCS), em rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Tricrômico de Masson - X400).....	99
Figura 8	Hepatocitólise com afluxo inflamatório mononuclear (HI) em fígado de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X400).....	99
Figura 9	Fibrose estromal mínima (FEM) em zona 3 de lóbulo hepático de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Vermelho picrossirius - X400).....	100
Figura 10	Congestão venosa portal (CVP) em rato macho tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Vermelho picrossirius - X100).....	100
Figura 11	Alargamento dos lóbulos (AL) em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina X250).....	101
Figura 12	Infiltração inflamatória intersticial em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina X250).....	101

Figura 13	Processo erosivo bronquiolar (PEB) associado à exsudação leucocitária, em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X250).....	101
Figura 14	Agregados linfóides peribronquiolares (ALP) em tecido pulmonar de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X250).....	101
Figura 15	Espessamento de parede alveolar (EPA) por intensa exsudação leucocitária e histicotária em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X100).....	102
Figura 16	Espaço luminar ocupado por transudato (ELT) intra-alveolar em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X250).....	102
Figura 17	Comprometimento luminar decorrente de exsudação inflamatória em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina X400).....	102
Figura 18	Imagem de ponto escuro em rim de rata (satélite), 30 dias após o término do tratamento prolongado (13 semanas) com 135 mg/kg do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	137
Figura 19	Imagem de nódulo gorduroso em fígado de rato (satélite), 30 dias após o tratamento prolongado (13 semanas) com 405 mg/kg do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	137
Figura 20	Parênquima hepático de rato tratado durante 13 semanas com 405 mg/kg (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L., mostrando lesão necroinflamatória (LN) (Hematoxilina-eosina - X400).....	139
Figura 21	Portite mista (PM) em rato tratado durante 13 semanas com 405 mg/kg (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Hematoxilina-eosina - X100)....	139

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação das diferentes grafias de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	32
Quadro 2	Relação de nomes populares de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	33
Quadro 3	Principais constituintes químicos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	37
Quadro 4	Relação dos usos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. na medicina popular.....	42
Quadro 5	Estudos sobre efeitos biológicos de <i>Jatropha gossypifolia</i> .L.....	50
Quadro 6	Classificação toxicológica comparativa (DL ₅₀ e teste da dose fixa).....	60
Quadro 7	Protocolo utilizado na triagem farmacológica e comportamental.....	77
Quadro 8	Resultado da triagem fitoquímica com o EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L...	88
Quadro 9	Triagem farmacológica e comportamental no estudo toxicológico pré-clínico agudo (dose $\geq 1,8$ g/kg, v.o. com o EE de <i>Jatropha gossypifolia</i>)...	90
Quadro 10	Triagem farmacológica e comportamental no estudo toxicológico pré-clínico crônico (tratamento v.o. com o EE de <i>Jatropha gossypifolia</i>).....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Evolução ponderal diária de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	91
Tabela 2	Consumo médio diário de água (mL) de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	93
Tabela 3	Consumo médio diário de alimentos (g) por ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	94
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	96
Tabela 5	Parâmetros hematológicos de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	97
Tabela 6	Letalidade (%) em ratos tratados (n=6) com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	104
Tabela 7	Letalidade (%) em ratos (n=10) sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	107
Tabela 8	Evolução ponderal em ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	109
Tabela 9	Consumo semanal de água (mL) por ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	112
Tabela 10	Consumo semanal de alimentos (g) por ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	115
Tabela 11	Temperatura quinzenal (°C) de ratos (machos e fêmeas) sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	118
Tabela 12	Glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	121
Tabela 13	Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre a ambulação de ratos no experimento de Campo Aberto.....	123

Tabela 14	Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre o número de execuções do comportamento “levantar” (<i>rearing</i>) de ratos no experimento de Campo Aberto.....	124
Tabela 15	Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre o número de execuções do comportamento “limpeza” (<i>grooming</i>) de ratos no experimento de Campo Aberto.....	126
Tabela 16	Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre a defecação (avaliada em número de bolos fecais) de ratos no experimento de Campo Aberto.....	127
Tabela 17	Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre a atividade motora de ratos avaliada pelo tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do experimento de <i>Rota Rod</i>	128
Tabela 18	Parâmetros bioquímicos de ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	131
Tabela 19	Parâmetros hematológicos de ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	135

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Evolução ponderal (média $\pm$ e.p.m.) de ratos após tratamento com EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (5 g/kg v.o.).....	92
Gráfico 2	Consumo de alimentos (média $\pm$ e.p.m.) entre ratos após tratamento com EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (5 g/kg, v.o.).....	95
Gráfico 3	Evolução ponderal em machos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	110
Gráfico 4	Evolução ponderal em fêmeas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	110
Gráfico 5	Consumo semanal de água por ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	113
Gráfico 6	Consumo semanal de água por ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	113
Gráfico 7	Consumo semanal de alimentos por ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	116
Gráfico 8	Consumo semanal de alimentos por ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	116
Gráfico 9	Temperatura quinzenal (°C) de ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	119
Gráfico 10	Temperatura quinzenal (°C) de ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	119
Gráfico 11	Glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	122
Gráfico 12	Glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	122
Gráfico 13	Representação gráfica do efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre o número de execuções do comportamento “levantar” (<i>rearing</i>) de ratas no experimento de Campo Aberto.....	125

Gráfico 14	Representação gráfica do efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. sobre a atividade motora de ratas, avaliada pelo tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do experimento de <i>Rota Rod</i>	129
Gráfico 15	Glicemia (mg/dL) de ratos machos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Sat: satélite)	133
Gráfico 16	Níveis sanguíneos de proteínas totais (mg/dL) de ratos machos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. (Sat: satélite).....	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAPCC	Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações	23
ALT	Alanina aminotransferase	79
ANOVA	Análise de variância	86
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária	6
AST	Aspartato aminotransferase	79
BALT	<i>Bronchus-Associated Lymphoid Tissue</i>	149
BT	Bilirrubina total	132
Ca ⁺⁺	Cálcio	132
CAPES	Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior	4
CE	Comunidade Européia	60
CEME	Central de Medicamentos	27
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal	71
CHCM	Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média	79
CK	Creatinafosfoquinase	132
CL ₅₀	Concentração Letal Mediana ou Concentração Letal 50%	48
Cm	centímetro	34
DL ₅₀	Dose Letal Mediana ou Dose Letal 50%	6
DMNL	Dose máxima não letal	104
DMT	Dose Máxima Tolerada	145
EDTA	Sal do ácido etilenodiaminotetracético	78
EE	Extrato Etanólico	6
Ex	exemplo	24
F	fêmeas	60
FA	Fosfatase alcalina	132
g/dL	grama por decilitro	96
g/kg	gramas por quilograma	6
H	Hora	77
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média	79
HULW	Hospital Universitário “Lauro Wanderley”	69

K ⁺	Potássio	95
LABETOX	Laboratório de Ensaio Toxicológicos	69
LD50	Abreviatura para DL ₅₀ na língua inglesa	7
LDH	Lactato-desidrogenase	132
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica	4
M	machos	60
mEq/L	miliequivalente por litro	96
mg/dL	miligrama por decilitro	11
mg/kg	miligramas por kilograma	6
mg/mL	miligrama por mililitro	46
Mg ⁺⁺	Magnésio	132
min.	minutos	77
mm ³	milímetros cúbicos	97
n	número de indivíduos, da espécie avaliada, usados no experimento.	6
Na ⁺	Sódio	95
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>	145
p	Índice estatístico que representa a probabilidade de uma relação entre variáveis ser um mero acaso	86
p.o.	abreviatura de via oral na língua inglesa	7
PB	Estado da Paraíba	69
pg	picogramas	97
PPPM	Programa de Pesquisas em Plantas Medicinais	27
PQI	Programa de Qualificação Interinstitucional	4
RE	Resolução Específica	6
RNA	Ácido Ribonucléico	63
rpm	rotações por minuto	73
Sat	Grupo satélite	14
SINITOX	Sistema Nacional de Intoxicações Tóxico-Farmacológicas	23
SNA	Sistema Nervoso Autônomo	76
SNC	Sistema Nervoso Central	76
SRD	Sem raça definida	57

U/dL	Unidade por decilitro	96
U/l	Unidade por litro	96
UFMA	Universidade Federal do Maranhão	4
UFPB	Universidade Federal da Paraíba	4
v.o.	via oral	6
VCM	Volume Corpuscular Médio	79
μ^3	micrometros cúbicos	97
$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro	47

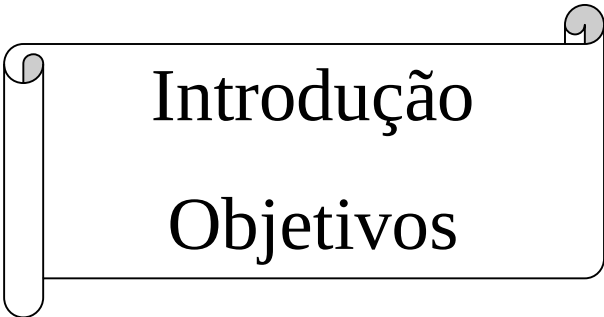
SUMÁRIO

CAPITULO I.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	30
2.1 A espécie <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	30
2.1.1 Aspectos botânicos.....	30
2.1.2 Aspectos químicos.....	35
2.1.3 Etnofarmacologia.....	41
2.1.4 Efeitos biológicos.....	44
2.2 Avaliação de toxicidade: princípios teóricos e práticos.....	51
3. OBJETIVOS.....	67
3.1 Geral.....	67
3.2 Específicos.....	67
CAPÍTULO II.....	68
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
4.1 Local da pesquisa.....	69
4.2 Material.....	69
4.2.1 Material botânico.....	70
4.2.2 Animais.....	70
4.2.3 Soluções e Reagentes.....	71
4.2.4 Aparelhagem.....	73
4.3 Metodologia.....	74
4.3.1 Obtenção do extrato etanólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	75
4.3.2 Estudo toxicológico pré-clínico agudo.....	75
4.3.2.1 Tratamento dos animais.....	76
4.3.2.2 Triagem farmacológica e comportamental e letalidade.....	76
4.3.2.3 Evolução ponderal e consumo de água e alimentos.....	78
4.3.2.4 Análise laboratorial de sangue.....	78
4.3.2.5 Estudo anatomopatológico.....	79
4.3.3 Estudo toxicológico pré-clínico crônico.....	80
4.3.3.1 Tratamento dos animais.....	80

4.3.3.2 Parâmetros avaliados durante o tratamento.....	81
4.3.3.2.1 Parâmetros avaliados diariamente.....	82
a) Triagem farmacológica e comportamental e letalidade.....	82
b) Evolução ponderal, consumo de água e alimentos.....	82
4.3.3.2.2 Parâmetros avaliados quinzenalmente.....	83
a) Temperatura colônica.....	83
b) Glicemia caudal.....	83
c) Teste do campo aberto (<i>open field</i>).....	84
d) Teste <i>Rota Rod</i>	84
4.3.3.3 Parâmetros avaliados após o tratamento.....	85
4.3.3.3.1 Análise laboratorial de sangue.....	85
4.3.3.3.2 Estudo anatomopatológico.....	86
4.3.4 <u>Análise estatística</u>	86
CAPÍTULO III.....	87
5. RESULTADOS.....	88
5.1 Características do Extrato Etanólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	88
5.2 Estudo toxicológico pré-clínico agudo.....	88
5.2.1 <u>Triagem farmacológica e comportamental</u>	89
5.2.2 <u>Evolução ponderal, consumo de água e alimentos</u>	90
5.2.3 <u>Análise laboratorial de sangue</u>	95
5.2.4 <u>Estudo anatomopatológico e letalidade</u>	98
5.3 Estudo toxicológico pré-clínico crônico.....	105
5.3.1 <u>Parâmetros avaliados durante o tratamento</u>	105
5.3.1.1 Parâmetros avaliados diariamente.....	105
a) Triagem farmacológica e comportamental e letalidade.....	105
b) Evolução ponderal, consumo de água e alimentos.....	107
5.3.1.2 Parâmetros avaliados quinzenalmente.....	117
a) Temperatura colônica.....	117
b) Glicemia caudal.....	120
c) Teste do campo aberto (<i>open field</i>).....	123
d) Teste <i>Rota Rod</i>	127
5.3.2 <u>Parâmetros avaliados após o tratamento</u>	129
5.3.2.1 Análise laboratorial de sangue.....	129

5.3.2.2 Estudo anatomopatológico.....	137
6. DISCUSSÃO.....	141
CAPÍTULO IV.....	161
7. CONCLUSÕES.....	162
REFERÊNCIAS.....	163
ANEXO.....	186

Capítulo I



Introdução

Objetivos

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o ser humano tem buscado cura ou alívio para suas enfermidades e dores através de diferentes modalidades terapêuticas. Todas elas têm em comum a compreensão de que a doença corresponde a um desequilíbrio do funcionamento normal do organismo resultante da interação desse com um agente patógeno qualquer. Tal problema deve, portanto, ser resolvido através do enfraquecimento deste corpo estranho e/ou pelo fortalecimento dos mecanismos de defesa do organismo, a fim de que, o indivíduo tenha então, condições propícias à recuperação do seu equilíbrio funcional.

Entre as diversas formas de tratamento das doenças humanas, a utilização de remédios e medicamentos originados de plantas, chamada de fitoterapia, tem se destacado como alternativa terapêutica. O mercado de produtos fitoterápicos tem crescido grandemente em todo o mundo. Apenas na Europa e nos Estados Unidos, no ano de 2000, estimava-se algo em torno de 7 e 5 bilhões de dólares por ano, respectivamente. Nos países em desenvolvimento, cerca de 65 a 80 % da população depende essencialmente de plantas medicinais na atenção primária à saúde (CALIXTO, 2000).

No Brasil, o uso elevado de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos ocorre devido a fatores diversos, entre os quais podemos destacar: a imensa variedade de espécies vegetais com potencial terapêutico existentes em nosso território; o relativo baixo custo financeiro dos produtos fitoterápicos, o que os torna mais acessíveis à população de baixa renda e até mesmo por questões culturais (TESKE e TRENTINI, 1994; OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998; CALIXTO, 2000; LAPA et al., 2000).

O uso de plantas medicinais e derivados tem percorrido uma longa trajetória histórica, sempre na tênue linha divisória entre o bem e o mal, ou seja, entre a restauração da saúde e o surgimento de efeitos colaterais e/ou adversos. Isso talvez ocorra, principalmente, pelo fato de que o uso “terapêutico” de plantas se expandiu pelo inconsciente coletivo popular como algo inofensivo seguindo a máxima: “se é natural, não faz mal”. Pensamento este, incoerente com os registros de intoxicação humana por plantas, inclusive por aquelas usadas como medicinais.

Segundo a Associação Americana de Centros de Controle de Intoxicações (AAPCC), só no ano de 1998 foram registradas 122.578 intoxicações por plantas nos Estados Unidos. No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), nos anos de 1985 a 1993 foram 8.236 casos. Dados mais recentes informam que o problema persiste. Nos Estados Unidos no ano de 2005, ocorreram 68.847 casos, segundo a AAPCC. Em nosso país, somente no ano de 2004, ocorreram 1.570 intoxicações por plantas. (BORTOLETTO et al., 1996; LING et al., 2005; LAI et al., 2006; SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS, 2007).

As plantas medicinais e produtos derivados não são inócuos pelo simples fato de serem naturais e também não são desprovidos de riscos apenas por serem usados como remédios ou medicamentos. Dados do SINITOX informam que os medicamentos correspondem aos principais agentes causais de intoxicações no Brasil com uma prevalência de 28,96 % dos casos registrados no ano de 2004. Tais intoxicações medicamentosas, em muitos casos fatais, nos levam a refletir sobre os motivos que fazem com que produtos elaborados com o propósito de restaurar a saúde e promover a vida se transformem exatamente no oposto, atuando como patógenos e, por vezes, até

mesmo como causadores de mortes. (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS, 2007).

Há muito tempo atrás, o sábio Paracelsus já apregoava: “... todas as substâncias são venenosas e não há o que não seja veneno. A dose certa diferencia um remédio de um veneno”. Atualmente, o conhecimento disponível nos permite entender que existem outros fatores, além da dose, que podem transformar um remédio em veneno. São fatores relacionados às condições de exposição podendo estar ligados tanto ao produto utilizado (dose, frequência de uso e/ou exposição, forma farmacêutica etc.) quanto ao organismo usuário (idade, sexo, raça, estados fisiopatológicos etc.) e até mesmo ao meio em que se dá o uso (ex: uso recreacional de psicofármacos) (LARINI, 1993; AMARAL; BARCIA, 2003).

Contudo, apenas ao se reconhecer o valor histórico e vanguardista da reflexão de Paracelsus é que se pode atentar para a complexidade dos fatores que interagem na caracterização da intoxicação como fenômeno biológico. Este conhecimento nos traz uma responsabilidade muito maior no sentido de buscarmos conhecer não somente a eficácia como também a segurança de produtos extremamente usados pela nossa população, como as plantas medicinais e os medicamentos fitoterápicos, a fim de melhorarmos a saúde e, conseqüentemente, a qualidade de vida das pessoas. Ou seja, grande parte desse problema parece relacionar-se com a questão do uso inadequado desses produtos. Os medicamentos não são essencialmente bons ou maus, os efeitos benéficos ou maléficos por eles causados dependerão, primariamente, da utilização que se dá a eles.

Portanto, o uso irracional de plantas medicinais e derivados se apresenta como um grave problema de saúde pública em nosso país por diversos fatores, tais como: automedicação inadequada; uso de produtos fora de um padrão mínimo de

qualidade e ainda desinformação sobre os riscos associados ao medicamento; fatores que concorrem para a ocorrência de intoxicações por esses produtos (BORTOLETTO et al., 1996; CALIXTO, 2000; AMARAL; COUTINHO; MESQUITA, 2001; BRANDÃO et al., 2001; MARIZ et al., 2001; TUROLLA, 2004).

Entretanto, a trajetória humana ao longo dos anos não se constitui apenas de gerar dificuldades para si mesmo e para o meio em que vive. Até por um instinto de sobrevivência, o ser humano dedica grande parte do seu esforço intelectual na ampliação horizontal e vertical de conhecimentos que permitam solucionar, ou pelo menos atenuar, os problemas que o afligem.

A fim de colaborar na promoção do uso racional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, vários modelos para estudos experimentais têm sido desenvolvidos objetivando melhor conhecer as ações orgânicas de constituintes vegetais e uma previsão mais exata de seus efeitos, sejam eles benéficos ou prejudiciais ao usuário. Os efeitos prejudiciais ao organismo, conhecidos como efeitos tóxicos, são objetos de estudo da Toxicologia, qualquer que seja a substância química causadora. Atualmente, essa ciência trabalha, cada vez mais, dentro de um princípio que consiste em conhecer os riscos da exposição humana as mais diversas substâncias químicas para estabelecer condições seguras de exposição a estes agentes (BARROS; DAVINO, 2003). Tal conhecimento se obtém através de ferramentas, principalmente, a avaliação de toxicidade, abordada no item 2.2 desta tese. Esses estudos quando feitos com medicamentos fitoterápicos, se constituem como um poderoso instrumento colaborador para a promoção do uso racional de tais produtos (LAPA et al., 2000).

Na perspectiva de que os benefícios da fitoterapia, enquanto terapêutica alternativa, bem como da utilização de medicamentos derivados de plantas, só podem acontecer quando tais práticas se dão sob certos princípios de eficácia e segurança, é

que as autoridades de saúde pública, inclusive no Brasil, têm demonstrado preocupação crescente com a matéria. Nas últimas décadas, os esforços conjuntos da comunidade científica, profissionais de saúde e educação e autoridades competentes têm contribuído decisivamente para uma melhora significativa em vários aspectos relacionados ao consumo de medicamentos fitoterápicos pela população em geral.

Inicialmente, deve-se saber com clareza o que são, de fato, tais produtos. Medicamentos fitoterápicos ou fitomedicamentos são preparações padronizadas contendo uma mistura complexa de partes de uma ou mais plantas no estado natural ou processado. São obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Desse modo, medicamentos contendo substâncias ativas isoladas ou quimicamente definidas, ou ainda produtos homeopáticos com constituintes vegetais não são considerados medicamentos fitoterápicos. Geralmente, os princípios ativos são desconhecidos e o produto é destituído de uma ação farmacológica imediata e forte sendo desaconselhado seu uso em tratamentos de emergência. São caracterizados por possuírem eficácia e risco de uso conhecidos, bem como, qualidade reprodutível e constante. Aspectos como eficácia e segurança podem ser validados através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações, ou ainda, ensaios clínicos de fase 3. (CALIXTO, 2000; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(a)).

Essa padronização conceitual tem sido fundamental para o desenvolvimento de estudos nos mais diversos aspectos relacionados aos fitomedicamentos, como: eficácia, segurança, controle de qualidade, regulamentação e, até mesmo, aspectos econômicos (CALIXTO, 2000).

Um marco concreto da preocupação das autoridades brasileiras em estabelecer uma política pública de utilização de plantas medicinais foi a criação, em

1983, do Programa de Pesquisa em Plantas Medicinais (PPPM) pela Central de Medicamentos (CEME) órgão do Ministério da Saúde, na época. No mesmo ano, esse órgão nomeou a Comissão de Ensaio Pré-Clínicos e Clínicos (CENTRAL DE MEDICAMENTOS, 1983). Essa comissão possuía a finalidade de melhorar a norma vigente sobre a avaliação farmacológica e toxicológica de novos produtos, que era muito inespecífica (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1978).

Desde então, várias medidas regulatórias se sucederam sempre no intuito de transformar a fitoterapia em uma prática terapêutica cada vez mais racional. De um modo específico, a preocupação com a segurança de fitomedicamentos tem se materializado, ao longo dos anos, em medidas legais que normatizam os estudos toxicológicos para o registro desses produtos. No Brasil, já há algum tempo, existe uma regulamentação específica para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica e clínica com vistas ao registro de medicamentos fitoterápicos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1996). Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004 b).

De um modo geral, os ensaios de avaliação toxicológica compreendem a execução de protocolos experimentais padronizados em espécies vegetais ou animais (fase pré-clínica) e até mesmo na espécie humana (fase clínica). Na fase pré-clínica, o organismo escolhido para ser avaliado em um modelo experimental pode ser tratado com altas doses do produto em curto espaço de tempo (avaliação da toxicidade aguda) ou exposto por tempo prolongado a doses relativamente menores (toxicidade crônica), sempre no intuito de antever eventuais efeitos tóxicos das substâncias químicas presentes no objeto de estudo. Quanto maior for o número de parâmetros orgânicos

monitorados e mais específicos forem estes indicadores, tão melhor será a avaliação toxicológica no que diz respeito ao fornecimento de dados que contribuam com uma maior segurança na utilização do produto pelo consumidor; neste caso o paciente (LU, 1991; LARINI, 1993; BRITO, 1994; LAPA et al., 2000; BARROS; DAVINO, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b); SÁ; ALMEIDA, 2006).

Deve-se considerar que a utilização de medicamentos, por pacientes quaisquer, exige, devido a óbvios aspectos bioéticos, cuidados muito mais intensos que outras relações de consumo. Nessa perspectiva, destaca-se a importância da avaliação de efeitos tóxicos eventualmente causados por fitoterápicos. Esses estudos não pretendem combater a fitoterapia enquanto modalidade de tratamento de enfermidades, mas sim, objetivam fomentar seu desenvolvimento racional ao contribuir para uma utilização segura de fitoterápicos através do gerenciamento de informações sobre eventuais danos à saúde associados ao uso desses produtos.

O objeto do presente estudo, a *Jatropha gossypifolia* L., é um típico exemplo desse duplo aspecto (terapêutico/tóxico) que possuem certos produtos com atividade biológica. Essa planta é conhecida popularmente como pião-roxo, além de diversos outros nomes, sendo encontrada nas obras de referência como espécie vegetal de alta toxicidade. No entanto, existem relatos de uso na medicina popular de produtos originados dessa planta, alguns dos quais têm sido comprovados, ao longo dos anos, através de estudos científicos sobre aspectos botânicos, químicos e farmacológicos com a referida espécie.

Entretanto, poucos e inconclusivos são os estudos toxicológicos realizados com preparações oriundas de *Jatropha gossypifolia* L., conforme detalhado no item 2.1.4 deste trabalho. Esse fato é preocupante não somente pela ampla e diversificada

utilização popular dessa planta, como também pela toxicidade bem conhecida dessa espécie *in natura*, assim como de outras espécies do mesmo gênero.

Assim, fica evidente a importância da realização de estudos toxicológicos sistematizados com a planta. Este trabalho se propôs a avaliar a toxicidade pré-clínica do pião-roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). Inicialmente, mediante uma revisão bibliográfica, o presente estudo oferece uma fonte condensada de informações sobre a referida espécie em aspectos diversos, tais como: características botânicas e composição química; usos terapêuticos populares e efeitos biológicos comprovados cientificamente, bem como os poucos estudos toxicológicos realizados até o momento.

Essa aglutinação de informações sobre a planta em estudo, bem como uma breve revisão sobre as atualidades acerca dos princípios teóricos e práticos da avaliação de toxicidade nos permitiu planejar e conduzir, de modo mais otimizado, os protocolos experimentais para o estudo pré-clínico da toxicidade (aguda e crônica) do extrato etanólico de partes aéreas (folhas e caule) de *Jatropha gossypifolia* L.

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Algumas considerações são importantes que sejam destacadas como os aspectos diversos relacionados à espécie vegetal em estudo, bem como os princípios práticos e teóricos dos procedimentos de avaliação de toxicidade.

2.1 A espécie *Jatropha gossypifolia* L.

Discutiremos, a seguir, aspectos relevantes dessa espécie vegetal como sua botânica, química, etnofarmacologia e, por fim, seus efeitos biológicos.

2.1.1 Aspectos botânicos

A espécie *Jatropha gossypifolia* L. pertence à família *Euphorbiaceae*; gênero: *Jatropha*; subgênero *Jatropha*; secção: *Jatropha* e subsecção: *Adenophorae*. O gênero *Jatropha* é considerado como, morfológicamente, diverso possuindo de 165 a 175 espécies distribuídas por países de climas tropical, subtropical e tropical seco. Ocorre principalmente em regiões semi-áridas tropicais da África e Américas. Possui dois subgêneros, o *Jatropha* e o *Curcas*, 10 seções e 10 subseções. O subgênero *Jatropha* é o mais amplamente distribuído possuindo espécies na África, Índia, América do Sul, Antilhas, América Central e Caribe. Esse gênero possui grande importância econômica, pois várias de suas espécies, como *Jatropha gossypifolia* L., possuem além do emprego medicinal, o uso ornamental, inclusive

como cercas-vivas, graças à fácil propagação de suas sementes (OLWOKUDEJO, 1993; SILVA, 1998; LEAL; AGRA, 2005).

Essa espécie (*Jatropha gossypifolia* L.) em nosso país é mais conhecida popularmente como pião-roxo, mas possui diversos outros nomes comuns no Brasil e pelo mundo afora. Nos quadros 1 e 2 relacionam-se, respectivamente, as diferentes grafias do nome científico da espécie e os nomes populares usados para essa planta em vários países do mundo.

Grafia	Referência
<i>Jatropha gossipifolia</i> L.	Ogbobe e Akano (1993); Taylor et al. (1996).
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Hecker (1984); Costa et al. (2001).
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Sievers et al. (1949); Saha, Savini e Kasinathan (1961); Morton (1968); Subramanian, Nagarajan e Sulochana (1971); Sultanbawa et al. (1978); Gasperi-Campani et al. (1980); Chatterjee et al. (1981); Ferrigni et al. (1982); Meyer et al. (1982); Adewunmi e Marquis (1983); Adolf, Opferkuch e Hecker (1984); Banerji et al. (1984); Prakash (1986); Weniger et al. (1986); Chatterjee et al. (1988); Das e Banerji (1988); Bhat, Etejere e Oladipo (1990); Carbajal et al. (1991); Joshi (1991); Guirola, Garcia e Torrealba (1992); Prasad, Alawkararao e Baby (1993); Abreu, Bezerra e Borges (1994); Das e Das (1995); Das, Rao e Srinivas (1996); Das et al. (1996); Horsten et al. (1996); Awachie e Ugwu (1997); Das e Kashinatham (1997); Chariandy et al. (1999); Das e Venkataiah (2001); Lans et al. (2001); Das et al. (2003); Ravindranath et al. (2003); Matos (2004); Singh e Singh (2005); Kumar et al. (2006).
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Das e Anjani (1999).
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Kupchan et al. (1970); Kupchan et al. (1976); Gupta, Arias e Correa (1979); Purushothaman e Chandrasekharan (1979); Adewunmi e Marquis (1980); Rojas e Acosta (1980); Adesina (1982); Taylor et al. (1983); Corrêa (1984); Le Grand e Wondergem (1987); Macrae, Hudson e Towers (1988); Singh e Agarwal (1988); Gbeassor et al. (1989); Le Grand (1989); Tinto e Jonh (1992); Olowokudejo (1993); Barret (1994); Paes, Borges e Rocha (1995); Rocha et al. (1995); Sukumaran, Parashar e Rao (1995); Coe e Anderson (1996)a ; Coe e Anderson (1996)b; Paes, Rocha e Borges (1996); Silva (1998); Borges et al. (2001); Abreu e Borges (2002); Abreu et al. (2002)a; Abreu et al. (2002)b; Bebawi e Campbell (2002)a; Bebawi e Campbell (2002)b; Bebawi e Campbell (2002)c; Castro et al. (2002); Silva et al. (2002)a; Silva et al. (2002)b; Abreu et al. (2003); Vitelli e Madigan (2004).
<i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Adewunmi (1984); Adewunmi e Adesogan (1986); Adewunmi e Marquis (1987)a; Adewunmi e Marquis (1987)b.

Quadro 1. Relação das diferentes grafias de *Jatropha gossypifolia*

Nome(s) popular(es)	Local	Referência(s)
<i>Ake m bogbo</i>	Nigéria	Bhat, Etejere e Oladipo (1990).
<i>Babatid jin</i>	Oeste da África	Gbeassor et al. (1989).
Batata de teú	Brasil	Corrêa (1984).
<i>Belly-ache bush</i>	Curaçao	Hecker (1984); Bebawi e Campbell (2002)a; Bebawi e Campbell (2002)b; Bebawi e Campbell (2002)c.
<i>Biorchi</i>	Nigéria	Bhat, Etejere e Oladipo (1990).
<i>Botife pupa</i>		
<i>Cassava marble</i>	Nicarágua	Barret (1994).
Erva-purgante	Brasil	Corrêa (1984).
<i>Étamanane hitu</i>	Senegal	Le Grand e Wondergem (1987).
<i>Fraila</i>	Curaçao	Morton (1968).
<i>Frailecillo</i>	Panamá	Gupta, Arias e Correa (1979).
Jalapão	Brasil	Corrêa (1984).
<i>Lapalapa pupa</i>	Nigéria	Adewunmi e Marquis (1987)a; Adewunmi e Marquis (1987)b; Matos (2004).
Mamoninha	Brasil	Corrêa (1984).
<i>Médecinier Cathartique</i>	Colonos franceses	
<i>Medsiyen barachen</i>	Haiti	Weniger et al. (1986).
<i>Parrotty gräs</i>	Nicarágua	Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b.
Pião-roxo	Brasil	Corrêa (1984); Matos (2004).
Pinhão-roxo		
<i>Quelite de fraile</i>	Nicarágua	Barret (1994).
Raiz de teú	Brasil	Corrêa (1984).
<i>Ratanjhad</i>	Índia	Joshi (1991).
<i>Ratanjyot</i>	Índia	Joshi (1991).
<i>Sajyon</i>	Nepal	Taylor et al. (1996).
<i>Sibidigua</i>	Venezuela	Guirola, Garcia e Torrealba (1992).
<i>Sosori</i>	Nicarágua	Barret (1994).
<i>Túa-túa</i>	Cuba	Corrêa (1984); Carbajal et al. (1991).
	República Dominicana	Corrêa (1984).
	Venezuela	Guirola, Garcia e Torrealba (1992).
<i>White/Red Physic Nut</i>	Trinidad	Lans et al. (2001).

Quadro 2. Relação de nomes populares de *Jatropha gossypifolia* L.

A figura 1 apresenta uma imagem de partes aéreas de um exemplar de *Jatropha gossypifolia* L. Essa espécie apresenta-se como uma árvore de folhas alternas, revestidas de pêlos, grandes, com partes lobadas. As flores são roxas, dispostas em cimeiras paniculadas; fruto pequeno (1 cm de comprimento), capsular contendo de 1 a 3 sementes escuras com pintas pretas e ricas em óleo (CORRÊA, 1984; SCHVARTSMAN, 1992).



Figura 1. Imagem das partes aéreas de um exemplar de *Jatropha gossypifolia* L.

Através da microscopia eletrônica, Olowokudejo (1993) apresenta um estudo comparativo da epiderme de folha de espécies de *Jatropha* como forma de contribuição para diferenciação taxonômica dentro do gênero. Segundo o referido trabalho, as folhas de *Jatropha gossypifolia* L. sempre possuem cera, em pelo menos uma das suas superfícies (abaxial ou adaxial) sem a presença de sulcos. Existem

estômatos paracíticos e/ou braquiparacíticos nas duas superfícies da folha. Tais estômatos possuem bordas cuticulares grossas. Ainda na epiderme, percebe-se a presença de pêlos uniseriados e glândulas alongadas.

O período de coleta relatado é bastante variado, em função da finalidade de cada estudo. Contudo, o mais freqüentemente citado é o correspondente aos meses do segundo semestre, principalmente de agosto a novembro (ADEWUNMI; ADESOGAN, 1986; DAS; RAO; SRINIVAS, 1996; DAS et al., 1996; DAS; KASHINATAM, 1997; DAS; ANJANI, 1999), mas também, em meses do primeiro semestre, como por exemplo, maio (ADEWUNMI; MARQUIS, 1980; PRASAD; ALAWKARARAO; BABY, 1993; AWACHIE; UGNU, 1997). Ainda existem relatos de coleta de partes da planta entre os meses de dezembro e janeiro (TAYLOR et al., 1996) e ao longo de todo o ano (CARBAJAL et al., 1991; CHARIANDY et al., 1999).

2.1.2 Aspectos químicos

A composição química de *Jatropha gossypifolia* L. é bem diversificada. Vários estudos realizados nas últimas décadas através de técnicas diversas como cromatografia, espectroscopia, ressonância magnética nuclear, entre outras têm contribuído significativamente para identificação qualitativa e quantitativa dos constituintes e conseqüentemente, a compreensão dos efeitos biológicos dessa espécie. De um modo geral, é possível afirmar que os exemplares dessa planta possuem ácidos orgânicos, alcalóides, terpenóides, esteróides, flavonóides, lignanas e taninos.

A extração dos constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia* L. tem sido realizada de formas diferentes de acordo com a finalidade do estudo. O principal solvente extrator empregado é o etanol; entretanto, outros trabalhos apresentam substâncias diversas isoladas ou em misturas, tais como: acetato de etila; água destilada; água, etanol e acetato de etila; clorofórmio e metanol; etanol e acetona; éter de petróleo; éter de petróleo e clorofórmio; éter dietílico; hexano; hexano e etanol; metanol e ainda, metanol e butanol.

O principal constituinte ativo do pião-roxo é um diterpeno chamado jatrofona (figura 2), cujas propriedades químicas e físicas já foram bem investigadas (MATOS, 2004). O Quadro 3 relaciona, além desse, outros dos principais constituintes de *Jatropha gossypifolia* L. identificados até o momento, sendo que, em alguns trabalhos também existe o relato acerca do órgão vegetal onde foram identificados tais constituintes, e ainda, o(s) solvente(s) empregado(s) na extração.

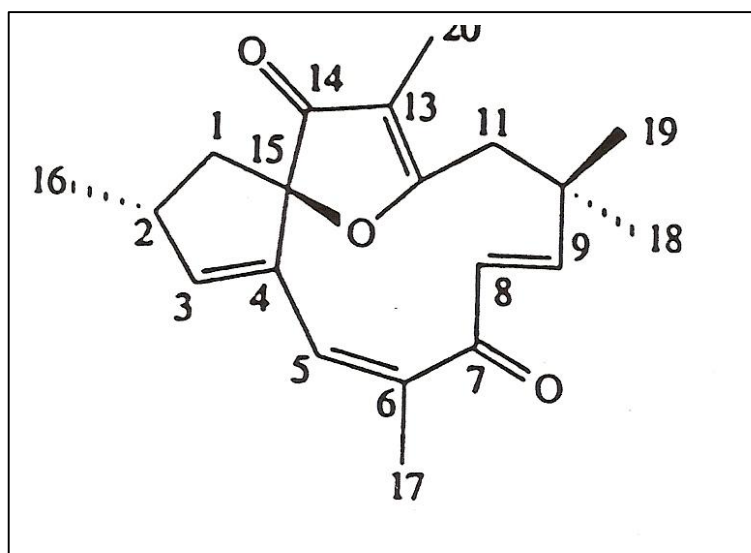


Figura 2. Fórmula estrutural da jatrofona, principal constituinte químico de *Jatropha gossypifolia* L (MATOS, 2004).

Grupo	Substância	Parte vegetal	Solvente extrator	Referência
Ácidos graxos	Ácido araquídico	Sementes	-	Matos (2004).
	Ácido araquidônico			
	Ácido beênico			
	Ácido caprílico	Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
			-	Matos (2004).
	Ácido esteárico	Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993); Matos (2004).
	Ácido lignocérico	Sementes	-	Matos (2004).
	Ácido linoleico	Sementes	-	Prasad, Alankararao e Baby (1993); Matos (2004).
	Ácido mirístico			
	Ácido oleico	Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
			-	Matos (2004).
	Ácido palmítico	Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
			-	Matos (2004).
	Ácido palmitoleico	Sementes	-	Matos (2004).
Açúcares	Arabinose	Sementes	-	Prasad, Alankararao e Baby (1993); Matos (2004).
	Ramnose			
	Xilose			
Alcaloides	Jatrofina (<i>Jatrophine</i>)	Folhas	Água	Gupta, Arias e Correa (1979).
		Raiz		Morton (1968).
	-	Folhas	Água	Coe e Anderson (1996)a; Gupta, Arias e Correa (1979).
			Clorofórmio e metanol	Coe e Anderson (1996)b.
		Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
		Látex	-	Matos (2004).

Quadro 3. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia* L.

Amino ácidos	Ácido aspártico	Sementes	-	Prasad, Alankararao e Baby (1993); Matos (2004).
	Ácido glutâmico			
	Alanina			Matos (2004).
	Arginina			
	Cistina			Prasad, Alankararao e Baby (1993); Matos (2004).
	Glicina			
	Isoleucina			Matos (2004).
	Leucina			
	Metionina			Prasad, Alankararao e Baby (1993); Matos (2004).
	Prolina			
	Treonina			
	Valina			
Cumarinas	Cleomiscosina A (<i>Cleomiscosin A</i>)	Caule	Hexano-Etanol	Das et al. (2003).
	Cumarina (7,8-dihidróxi- 6-metóxi-cumarina)	Raiz	Acetato de etila	Das e Kashinatan (1997).
	Fraxetina	Raízes	Acetato de etila	Das e Kashinatan (1997).
	Propacina (<i>Propacin</i>)	Toda a planta	Clorofór mio e metanol	Das e Venkataiah (2001)
Diterpenos	Jatrofenona (<i>Jatrophene</i>)	Toda a planta	Clorofór mio e metanol	Ravindranath et al. (2003)
	Jatrolona A (<i>Jatrolone A</i>)	Raiz e folhas	Etanol	Adesina (1982); Matos (2004).
		Raiz	-	Purushothaman e Chadrsekharan (1979).
	Jatrolona B (<i>Jatrolone B</i>)	Raiz e Folhas	Etanol	Adesina (1982); Matos (2004).
		Raiz	Acetato de etila	Das e Kashinatan (1997).
		-	-	Purushothaman e Chadrsekharan (1979).
	Jatrolona	Raiz	Etanol	Kupchan et al. (1970). Kupchan et al. (1976).
		Toda a planta	-	Matos (2004).
	2 α -OH-Jatrolona 2 β -OH-Jatrolona 2 β -OH-5,6-Isojatrolona	Raiz	Éter de petróleo e clorofór- Mio	Taylor et al. (1983).

Quadro 3. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia* L. (continuação).

Esteróides	-	Caules e Folhas	Etanol	Abreu et al. (2003); Mariz et al. (2006)
		Folhas	-	Matos (2004).
Fenóis	-	Caules e Folhas	Etanol	Abreu et al. (2003).
		Látex	-	Matos (2004).
Fibras	-	Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
			-	Matos (2004).
Fitotoxinas	-	Folhas	Água	Gupta, Arias e Correa (1979).
Flavonóides	Apigenina	Folhas	Etanol	Subramanian, Nagarajan e Sulochana (1971)
			-	Matos (2004).
	-	Caules e Folhas	Etanol	Abreu et al. (2003); Mariz et al. (2006)
	Ácido ferúlico	Raízes	Acetato de etila	Das e Kashinatan (1997).
	2,3-bis-(hidroximetil)-6,7-metilenodioxo-1-(3'4'-dimetoxifenil)-naftaleno	Toda a planta	-	Matos (2004).
	Diidroprasantalina	Toda a planta	-	Matos (2004).
	Gadaína	Raízes, caules e sementes	Éter de petróleo	Banerji et al. (1984)
		Toda a planta	-	Matos (2004).
	Gossypidieno (<i>Gossypidien</i>)	Caule	Hexano	Das e Anjani (1999).
	Gossipifana (<i>Gossypifan</i>)	Partes aéreas	Éter de petróleo	Das e Das (1995).
		Toda a planta	-	Matos (2004).
	Isogadaína	Caule	Éter de petróleo	Das et al. (1996).
				Das, Rao e Srinivas (1996).
		Toda a planta	-	Matos (2004).
	Isovitexina	Folhas	Etanol	Subramanian, Nagarajan e Sulochana (1971)
	Vitexina		-	Matos (2004).

Quadro 3. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia* L. (continuação).

Lignanais	Jatrodieneo	Caule	Éter de petróleo	Das et al. (1996).
				Das, Rao e Srinivas (1996).
		Toda a planta	-	Matos (2004).
	Jatrofana (<i>Jatrophan</i>)	Caule, raiz e sementes	Éter de petróleo	Chatterjee et al. (1981).
	Jatratriona	Raiz	Etanol	Matos (2004).
	Lignana aril naftaleno	Caule, raiz e sementes	Éter de petróleo	Das e Banerji (1988).
	2-Piperonilideno-3-veritril-3R-ã-butirolactona	Toda a planta	-	Matos (2004).
	Prasantalina	Partes aéreas	Éter de petróleo	Chatterjee et al. (1988).
		Toda a planta	-	Matos (2004).
	Tetradecil ferrulato (<i>Tetradecyl (E)-ferulate</i>)	Raízes	Etanol	Das e Kashinatham (1997).
		-	-	Kavitha, Raiasekhar e Subbaraju (1999).
Óleos	-	Raiz e folhas	Etanol	Adesina (1982).
		Sementes	Água	Adolf, Opferkuch e Hecker (1984).
			Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
			-	Matos (2004).
Outros	Ácido ascórbico	Látex	-	Matos (2004).
	Amirina (<i>â-Amyrin</i>)	Sementes	-	Prasad, Alankararao e Baby (1993).
	Forbol (12-dióxi,16-hidróxiforbol)	Sementes	Água	Adolf, Opferkuch e Hecker (1984).
	Sitosterol (β -Sitosterol)	Sementes	-	Prasad, Alankararao e Baby (1993).

Quadro 3. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia* L. (continuação).

Proteínas	Cicloglossina A	Látex	Água, etanol e acetato de etila	Horsten et al. (1996).
			-	Matos (2004).
	Cicloglossina B	-	-	Auvin-Guette et al. (1997).
			-	Matos (2004).
		Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
	-		-	Matos (2004).
Saponinas	-	Sementes	Éter de petróleo	Ogbobe e Akano (1993).
			Etanol e Butanol	Sukumaran, Parashar e Rao (1995).
			-	Matos (2004).
Taninos	-	Raiz e folhas	Etanol	Adesina (1982).
		Folhas	Água	Gupta, Arias e Correa (1979).
		Caules e Folhas	Etanol	Abreu et al. (2003).
				Mariz et al. (2006)
Tri terpenóides	-	Caules e Folhas	Etanol	Abreu et al. (2003).
		Folhas	-	Matos (2004).

Quadro 3. Principais constituintes químicos de *Jatropha gossypifolia* L. (continuação).

2.1.3 Etnofarmacologia

A utilização de plantas na terapêutica, enquanto elemento cultural de um povo, é importante fonte preliminar de informação na pesquisa com vistas ao desenvolvimento e promoção do uso racional de fitoterápicos.

As espécies do gênero *Jatropha* têm sido utilizadas popularmente, ao longo dos anos, no tratamento de males diversos. (CORREA, 1984; ADOLF;

OPFERKUCH; HECKER, 1984; DUKE, 1985; VILLAR; PAYA; TERCENIO, 1986; OBATOMI; BIKOMO; TEMPLE, 1994). A espécie *Jatropha gossypifolia* L. tem alta toxicidade principalmente devido às propriedades cáusticas e inflamatórias de algumas de suas partes, como por exemplo, o látex (OGBIBE e AKANO, 1993). Apesar disso, possui uma ampla variedade de indicações terapêuticas na medicina popular, algumas destas relacionadas no Quadro 4.

Uso popular	Referência
Anticonvulsivante	Adesina (1982).
Antidiabético	Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b; Obatomi, Bikomo e Temple (1994).
Antidiarréico	Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b; Castro et al. (2002).
Anti-gripal	Taylor et al. (1996).
Anti-helmíntico	Gupta, Arias e Correa (1979); Joshi (1991); Olowkudejo (1993).
Anti-hemorrágico	Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b; Matos (2004).
Anti-hipertensivo	Abreu, Bezerra e Borges (1994); Paes, Borges e Rocha (1995); Paes, Rocha e Borges (1996); Castro et al. (2002); Abreu et al. (2003); Matos (2004).
Antimicrobiano tópico	Macrae, Hudson e Towers (1988); Bhat, Etejere e Oladipo (1990); Olowkudejo (1993); Prasad, Alankararo e Baby (1993); Barret (1994); Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b; Horsten et al (1996); Taylor et al. (1996); Awachi e Ugnu (1997); Chariandy et al (1999).
Antinflamatório	Le Grand e Wondergem (1987); Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b.
Antitérmico	Adesina (1982); Olowkudejo (1993); Kumar et al. (2006).
Broncodilatador	Carbajal et al. (1991).
Câncer (tratamento)	Kupchan et al. (1970); Kupchan et al. (1976); Gupta, Arias e Correa (1979); Macrae, Hudson e Towers (1988); Prasad, Alankararo e Baby (1993); Taylor et al. (1996).
Cicatrizante	Le Grand (1989); Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b; Castro et al. (2002); Matos (2004).
Cólicas (tratamento)	Barret (1994).
Depurativo	Gupta, Arias e Correa (1979).
Digestivo, purgativo e laxativo	Gupta, Arias e Correa (1979); Adesina (1982); Macrae, Hudson e Towers (1988); Olowkudejo (1993); Abreu, Becerra e Borges (1994); Barret (1994); Paes, Borges e Rocha (1995); Coe e Anderson (1996)a; Coe e Anderson (1996)b; Paes, Rocha e Borges (1996); Matos (2004); Kumar et al. (2006).
Diurético	Castro et al. (2002); Matos (2004).

Quadro 4. Relação dos usos de *Jatropha gossypifolia* L. na medicina popular.

Uso popular	Referência
Dores de estômago e abdominais (tratamento)	Weniger et al. (1986).
Edema (tratamento)	
Emenagogo	Saha, Savini e Kasinathan (1961)
Fluxo menstrual irregular (tratamento)	Bhat, Etejere e Oladipo (1990).
Hidropsia (tratamento)	Abreu, Becerra e Borges (1994); Castro et al. (2002).
Reumatismo (tratamento)	Abreu, Becerra e Borges (1994); Paes, Borges e Rocha (1995); Paes, Rocha e Borges (1996); Castro et al. (2002); Matos (2004).
Úlceras (tratamento)	Castro et al. (2002).
Vermífugo	Adesina (1982).
Vomitivo	Barret (1994).

Quadro 4. Relação dos usos de *Jatropha gossypifolia* L. na medicina popular (continuação).

Outros usos dessa espécie vegetal, além dos terapêuticos, são citados na literatura. É fato a utilidade ornamental da planta devido à coloração arroxeada de suas folhas. Também são comuns os relatos de que preparados de *Jatropha gossypifolia* L. seriam úteis em rituais religiosos contra os maus espíritos ou para a população em geral com finalidades místicas diversas, como a crença de que seria uma das plantas que protegem caçadores e cães de caça de venenos animais. Ainda destaca-se o cultivo desta planta em seqüência para a construção de cercas-vivas contra incêndios e relâmpagos e a fixação de dunas. Outros benefícios para o ser humano seriam: o seu uso, por algumas populações, como inseticida; o emprego do óleo da semente tanto na preparação de tintas e sabões quanto como lubrificante e combustível para motores tipo Diesel e, ainda, na iluminação (OGBOBE; AKANO,

1993; OLOWKUDEJO, 1993; PRASAD; ALANKARARAO; BABY, 1993; CAMARGO, 1998; LANS et al., 2001; LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 2004).

2.1.4 Efeitos biológicos

A avaliação experimental dos efeitos biológicos de *Jatropha gossypifolia* L. desenvolveu-se a partir dos relatos populares de utilização dessa planta ou com base em outros estudos feitos com espécies do mesmo gênero. Apesar do reconhecido potencial tóxico de diversas espécies de *Jatropha* (ADOLF; OPFERKUCH; HECKER, 1984; ABDU-AGUYE et al., 1986; SCHVARTSMAN, 1992), vários autores têm demonstrado ações terapêuticas de substâncias químicas extraídas de algumas destas plantas.

A tetrametilpirazina, um alcalóide extraído do caule de *Jatropha podagrica* Hook, apresentou atividade bloqueadora neuromuscular, de relaxamento de musculatura lisa e hipotensora (OJEWOLE; ODEBYI, 1980; OJEWOLE; ODEBYI, 1981).

A jatrofona, um diterpeno extraído de tubérculos de *Jatropha elliptica*, possui atividade relaxante de musculatura lisa e cardíaca e capacidade de inibir a ligação do glutamato ao seu receptor sugerindo ação antinociceptiva (CALIXTO; SANTANA, 1987; TREBIEN et al., 1988; CALIXTO; SANTANA, 1990; DUARTE; SANTANA; CALIXTO, 1992; SILVA; BRUM; CALIXTO, 1995; MARTINI et al., 2000).

A espécie *Jatropha cillata* M. Arg. possui as substâncias orientina e isoorientina, com propriedades ansiolíticas, além do derivado cumarínico fraxetina com atividade analgésica (OKUYAMA et al., 1996).

Quanto à *Jatropha gossypifolia* L., espécie que ora nos propomos a estudar, alguns trabalhos já relatam suas propriedades terapêuticas, como por exemplo: moderado efeito sedativo e anticonvulsivante (ADESINA, 1982); efeito analgésico, de relaxante da musculatura lisa vascular e não vascular e como agente hipotensor (CORRÊA, 1984; PAES; BORGES; ROCHA, 1995; PAES; ROCHA; BORGES, 1996; ABREU et al., 2002(b); CASTRO et al., 2002).

O efeito hipotensor do extrato etanólico (EE) de *Jatropha gossypifolia* L. foi demonstrado por Abreu et al. (2003) pela redução significativa e dependente de dose, da pressão arterial sistólica em ratos normotensos e não anestesiados. Os percentuais de inibição foram de 10,9 % e 13,3 % para os grupos tratados, respectivamente, com doses de 125 mg/kg (v.o.) e 250 mg/kg (v.o.) do extrato. Os autores atribuem esse efeito a uma ação vasorelaxante e dependente de concentração. Tal ação foi demonstrada, experimentalmente, tanto pela capacidade do extrato de produzir relaxamento em preparação isolada de anéis de artéria mesentérica (sem endotélio), pré-contraídas com norepinefrina ou cloreto de cálcio, quanto pela propriedade desse mesmo extrato de inibir, de forma não-competitiva e concentração dependente, a contração vascular induzida pelos referidos agonistas. Os experimentos realizados permitem supor que o mecanismo de ação esteja relacionado com antagonismo não-competitivo em receptores α_1 ou em outros mecanismos pós-receptores e ainda com a inibição do influxo de cálcio através da membrana celular.

A *Jatropha gossypifolia* L. também tem sido estudada no que se refere à outras propriedades, como por exemplo, sua utilidade no combate e controle da esquistossomose em função do seu propalado efeito moluscicida. Essa atividade em um produto é importante pois, entre os moluscos encontram-se vários organismos vetores de agentes patógenos como o *Schistosoma mansoni*.

Existem relatos da eficácia de extratos de partes de *Jatropha gossypifolia* L. contra diversas espécies de moluscos: *Biomphalaria glabrata*; *Biomphalaria pfeifferi*; *Bulinus globosus*; *Indoplanorbis exustus* e *Lymnea luteola*. Também foi demonstrada a capacidade da espécie vegetal em promover elevação do débito cardíaco de *Biomphalaria glabrata* e *Archachatina marginata*, o que poderia corresponder ao mecanismo da atividade moluscicida do produto. Contudo, cabe ressaltar que essa atividade pode ser reduzida por fatores ambientais (ADEWUNMI, 1984; ADEWUNMI; MARQUIS, 1980; ADEWUNMI; ADESOGAN, 1986; ADEWUNMI; MARQUIS, 1987 (a); ADEWUNMI; MARQUIS, 1987 (b); SUKUMARAN; PARASHAR; RAO, 1995).

Inicialmente, Adewunmi e Marquis (1980) mostraram o significativo efeito moluscicida em *Biomphalaria globosus* do extrato metanólico do fruto de *Jatropha gossypifolia* L. quando comparado aos extratos de outras partes deste vegetal e de outras espécies, a saber, *Jatropha curcas* e *Jatropha podagrica*. Ainda ressaltam que tal efeito não é reduzido por radiação ultravioleta e acidificação da água, contudo, é bastante afetado por ionização da água (cálcio e magnésio) e por materiais absorventes. Adewunmi (1984) também apresenta essa espécie como eficaz contra moluscos da espécie *Biomphalaria globosus*.

A ação tóxica da nossa planta em *Biomphalaria glabrata* (importante espécie hospedeira de *Schistossoma*) também tem sido relatada, como sendo um moluscicida eficaz com concentração letal média de 15,7 mg/mL. Foi possível observar-se leve redução no débito cardíaco de *Biomphalaria glabrata* e *Archachatina marginata*, com posterior aumento, deste parâmetro, por longo período após exposição a concentrações do extrato vegetal de 10 a 100 mg/L (ADEWUNMI; ADESOGAN, 1986).

Todavia, Adewunmi e Marquis (1983) apresentaram que o extrato etanólico de *Jatropha gossypifolia* L., entre outras espécies, mostrou-se inativo até na dose de 2.000 µg/mL contra *Schistosoma haematobium* inoculado em *Biomphalaria glabrata*. Os autores não observaram efeito de morte de miracídeos, tampouco efeitos ovicida ou cercaricida do referido extrato.

Posteriormente, outros trabalhos têm apresentado resultados, nos quais o extrato aquoso desta espécie apresentou a menor atividade moluscicida, entre outras espécies avaliadas em *Biomphalaria globosus*, quando o experimento foi realizado sob a influência de fatores ambientais como correnteza da água, lodo e ervas daninhas presentes em mananciais aquáticos (ADEWUNMI; MARQUIS, 1987(a); ADEWUNMI; MARQUIS, 1987(b)).

Apesar de todas essas perspectivas de efeitos preventivos e/ou terapêuticos de *Jatropha gossypifolia* L., convém ressaltar que a validação do emprego de uma espécie vegetal na terapêutica não pode se dar apenas pela demonstração de sua atividade e eficácia. Há que se considerar a possibilidade de efeitos tóxicos.

Conforme já comentado, a espécie objeto de estudo deste trabalho corresponde a uma planta catalogada como tóxica, basicamente por possuir um látex extremamente cáustico para pele e mucosas. Seus constituintes e a clínica da intoxicação produzida por esta planta são relatados como sendo semelhantes aos da *Jatropha curcas* L. (pinhão-de-purga) cuja semente contém óleos fixos, resinas, alcalóides, glicosídeos e toxalbuminas. De um modo geral, a ingestão de partes do vegetal pode produzir efeitos purgativos e depressores dos sistemas respiratório e cardiovascular. Na intoxicação surgem, inicialmente, distúrbios do sistema digestório, acompanhados por dores intensas, desidratação, insuficiência renal e agravo cardiovascular. A evolução do quadro traz danos neurológicos, inclusive com torpor e

possibilidade de coma e morte (ADOLF; OPFERKUCH; HECKER, 1984; GUIROLA; GARCIA; TORREALBA, 1992; SCHVARTSMAN, 1992).

No entanto, devemos considerar que na terapêutica popular, as partes das plantas medicinais raramente são usadas *in natura*, mas sim, sob forma de preparações diversas como, por exemplo: chás, infusos e decoctos. Para obtenção dessas preparações as partes vegetais podem ser submetidas a processos tais como dessecação, trituração e maceração, o que por certo, altera a composição química original do órgão vegetal utilizado, possibilitando a eliminação de constituintes tóxicos e a obtenção de um produto menos tóxico que a planta *in natura* ou até mesmo, relativamente inócuo.

Estudos sobre avaliação de toxicidade com extratos de *Jatropha gossypifolia* L. têm evidenciado resultados diversos e ainda inconclusivos. Inicialmente, Gasperi-Campani et al. (1980), demonstraram que o extrato etéreo de sementes de *Jatropha gossypifolia* L. apresenta baixa toxicidade demonstrada pela fraca inibição da síntese protéica em reticulócitos de coelho. Ainda nesse sentido, estudos de avaliação de toxicidade *in vitro*, usando-se larva de camarão (*Artemia salina* Leach) e testando extratos de 41 espécies de Euforbiáceas, evidenciaram que os extratos etanólico e metanólico de *Jatropha gossypifolia* apresentaram baixa toxicidade indicada por uma concentração letal mediana (CL₅₀) superior a 1.000 µg/mL, para a referida espécie animal (MEYER et al., 1982; AWACHIE; UGNU, 1997).

Entretanto, Hecker (1984) apresenta suspeita de correlação positiva com incidência de câncer de esôfago, ao afirmar que a *Jatropha gossypifolia* L. está entre as espécies mais usadas por populações com alta prevalência dessa doença, além de destacar o fato de esta planta possuir tiglianas conhecidas como “fatores jatropha”. Assim, conclui que a *Jatropha gossypifolia* L. precisaria ser mais bem investigada quanto ao seu poder carcinogênico.

Rocha et al. (1995) relataram que o tratamento de ratos com o extrato etanólico de partes aéreas da planta por 30 dias (avaliação subcrônica) não produziu alterações bioquímicas e/ou hematológicas significativas nesses animais. Contudo, resultados ainda não publicados dos mesmos autores, apontam para uma significativa perda de peso (definhamento) sem alteração do consumo de ração em ratos tratados por um período mais longo (60 dias) com o extrato desta espécie vegetal.

Mais recentemente, Singh e Singh (2005) demonstraram a capacidade de *Jatropha gossypifolia* L. em causar redução dependente de dose da atividade das enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina bem como bloqueio da acetilcolinesterase em tecido nervoso de peixes (*Channa marulius*).

O Quadro 5 resume alguns dados acerca de estudos investigando efeitos biológicos do pião-roxo.

Efeito biológico	Parte vegetal	Solvente extrator	Referência
Analgésico	Folha e caule	Etanol	Castro et al. (2002).
Antidiarréico	Folha e caule	Etanol	Abreu, Bezerra e Borges (1994); Borges et al. (2001); Silva et al. (2002)a; Silva et al. (2002)b.
Antimalárico (<i>P. falciparum</i> “in vitro”)	Folhas	Água	Gbeassor et al. (1989).
Antimicrobiano	Folhas	Diclorometano e metanol (1:1)	Kumar et al. (2006).
Antitumoral e Antineoplásico	Raiz	Clorofórmio	Taylor et al. (1983).
		Etanol	Kupchan et al. (1970); Kupchan et al. (1976); Matos (2004).
Antiviral	Folhas e caules	Metanol	Macrae, Hudson e Towers (1988); Taylor et al. (1996).
	Córtex		
Hipotensor	Folha e caule	Etanol	Abreu et al. (2002)b; Abreu et al. (2003); Paes, Borges e Rocha (1995); Paes, Rocha e Borges (1996).
Irritante	Sementes	Água	Adolf, Opferkuch e Hecker (1984).
Moluscicida (combate à equistossomose)	Fruto	Etanol ou Metanol	Adewunmi e Marquis (1980); Adewunmi e Marquis (1983); Adewunmi (1984); Adewunmi e Adesogan (1986); Adewunmi e Marquis (1987)a Adewunmi e Marquis (1987)b.
	Látex	Água	Singh e Agarwal (1988); Matos (2004).
	Sementes	Metanol e n-Butanol	Sukumaran, Parashar e Rao (1995).
Piscida	Látex	Água	Singh e Singh (2005).
Sedativo e antileptazol (moderado)	Raiz e folhas	-	Adesina (1982).

Quadro 5. Estudos sobre efeitos biológicos de *Jatropha gossypifolia*.L.

Outros efeitos da referida espécie também foram avaliados em estudos que não especificam a parte vegetal utilizada. São eles: antimicrobiano intermediário para *Curvalaria clavata* e antimicrobiano leve para *Candida albicans* e *Bacillus subtilis* (AWAICHE; UGNU, 1997); efeito piscida (SINGH; SINGH, 2002) e promoção tumoral (NORHANOMA; YADAV, 2005) .

Diante do exposto, é possível constatar que dentre os aspectos mais importantes, já estudados em *Jatropha gossypifolia* L., existe de fato uma carência de estudos toxicológicos sequenciais com essa espécie. Tais estudos devem ser realizados somente após um delineamento experimental que seja norteado pelos princípios da moderna toxicologia, considerando a relevância e complexidade do tema, não somente no que diz respeito às questões técnicas, como também, e principalmente, a aspectos éticos de tais procedimentos.

2.2 Avaliação de toxicidade: princípios teóricos e práticos

A toxicidade de uma substância é a capacidade que esta tem em causar algum desequilíbrio ao organismo com o qual entra em contato, ou seja, refere-se ao potencial de um toxicante em produzir o efeito tóxico (BARROS; DAVINO, 2003). A importância de avaliar tal propriedade reside no fato de que toda e qualquer substância química pode vir a ser tóxica, dependendo de vários fatores, já comentados, relacionados à exposição, tais como: dose; frequência e duração da exposição; condições fisiológicas e/ou patológicas do organismo exposto etc.

Considerando-se que, na grande maioria dos casos, não é possível evitar por completo o contato do agente tóxico com o organismo, surge a necessidade de se conhecer ao máximo os riscos que a substância oferece, a fim de que sejam estabelecidas condições seguras de uso e/ou exposição. Assim, a necessidade de estudos

de avaliação de toxicidade serem conduzidos de modo científico e padronizado estimulou uma crescente estruturação metodológica da Toxicologia Experimental.

Os protocolos experimentais, nesse campo da ciência toxicológica, são muito importantes para o desenvolvimento de produtos tanto na fase investigativa quanto no momento do cumprimento das exigências legais para registro e comercialização. Tais estudos se desenrolam em duas grandes fases: a fase pré-clínica, realizada em espécies inferiores à humana na escala evolutiva e a fase clínica, onde os produtos que não demonstraram toxicidade significativa nos estudos pré-clínicos são então testados em humanos voluntários, sob rigorosos preceitos técnicos e éticos conforme comentado adiante.

As etapas de um estudo toxicológico pré-clínico são sequenciais e estão atualmente bem definidas. Podem apresentar pequenas variações de acordo com as exigências legais de cada país e até mesmo conforme a obra de referência consultada; todavia, existe um consenso sobre os tópicos descritos a seguir (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949; LU, 1991; LARINI, 1993; PAUMGARTTEN, 1993; BRITO 1994; BARROS; DAVINO, 2003; CORRÊA; ALONZO; TREVISAN, 2003; PAPARELLA; FASSOLD, 2004):

Ú Informações preliminares: antes de proceder qualquer experimento com um organismo, por mais simples que seja sua espécie ou estágio evolutivo, deve-se conhecer a substância a ser avaliada em aspectos como, por exemplo, estrutura e composição química (inclusive determinação qualitativa e quantitativa de eventuais impurezas), propriedades físico-químicas, aspectos toxicocinéticos, fontes e níveis de exposição, distribuição no ambiente etc. Atualmente, existem programas de informática que, a partir de algumas dessas informações, auxiliam na previsão de toxicidade da

referida substância. Enfim, toda e qualquer informação sobre o produto (e/ou seus constituintes) pode auxiliar no delineamento experimental.

Ú Testes *in vitro*: são conhecidos como métodos alternativos para avaliação toxicológica. Esses testes surgiram basicamente em função da crescente preocupação ética com a utilização de animais em experimentação biológica. Podem ser citados: a cultura de tecido ocular de bovinos para testes em cosmetologia, bem como o teste em membrana corioalantóica de ovos de galinha para avaliação de irritabilidade ocular, além de outros (ANDERSEN et al., 2004). Destaque especial merecem os ensaios utilizando larvas de camarão (MEYER et al, 1982) e de peixes (ictiotoxicologia) pelo baixo custo e praticidade de execução. O grande desafio nessa área é o desenvolvimento de testes que possam ser validados, ou seja, que demonstrem uma capacidade presuntiva para efeitos em animais, pelo menos, igual a do método que pretende substituir.

Ú Testes *in vivo*: apesar dos recentes avanços no desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação toxicológica, os melhores resultados em termos de preditibilidade de efeitos em humanos ainda são os obtidos em animais classicamente empregados em experimentação. As espécies mais usadas em investigações biomédicas são os roedores (95 %). Entre estes: ratos e camundongos (90 %), cobaias (2 %), *hamsters* (2 %) e outros (1 %) (NETTO, 2006).

Entretanto, antes mesmo da definição da espécie animal a ser utilizada, é preciso estar atualizado sobre preceitos éticos do uso de animais de laboratório. A relevância desse tema tem crescido nas últimas décadas em função do grande número de animais empregados em experimentos diversos e das freqüentes situações de sofrimento às quais eles são expostos. Segundo recente levantamento, o uso de animais em experimentação se dá, principalmente, para desenvolvimento e/ou registro de

produtos bioativos (40 a 50 %), mas também, para ensino (25 %) e diagnóstico (menos de 5 %) (CAZARIN et al., 2003; CAZARIN et al., 2004).

A ética pode ser compreendida como “estudo do bem” não somente para com os semelhantes (humanos), como para com todas as formas de vida ao nosso redor (RODRIGUES, 2002). Quando esse estudo se debruça sobre os temas da grande área da saúde, nasce a bioética que se desenvolve, em todo o mundo, mediante as transformações sociais ocorridas após a Segunda Guerra Mundial e também em decorrência das descobertas científicas a partir dos anos 60. Hoje, a bioética tem se tornado cada vez mais como um discurso em prol da tolerância fugindo da tentação de estabelecer absolutos morais (DINIZ; GUILHEM, 2002).

Um marco na longa e conturbada trajetória das discussões sobre o uso de animais em experimentação biológica foi a publicação, em 1959, por Willian Russel e Rex Burch, de um estudo detalhado apresentando o programa 3R's. Contudo, essas reflexões só passaram a ser consideradas na elaboração de leis e convenções durante a década de 80. Esse programa foi assim denominado em função de cada uma das iniciais das palavras, em inglês, que denotam seus principais objetivos: *Reduction* (redução), *Refinement* (refinamento) e *Replacement* (substituição) (CAZARIN et al., 2004).

A redução propõe que cada experimento use o menor número possível de animais. Convém evitar repetições desnecessárias e o uso de modelos animais irrelevantes na extrapolação para humanos, além de maximizar o número de informações obtidas por animal utilizado. No refinamento o objetivo é aprimorar os métodos no intuito de minorar, cada vez mais, o sofrimento animal. Por fim, a substituição propunha a troca de ensaios *in vivo* por *in vitro* sempre que possível e eficaz. Recomenda ainda a priorização experimental de espécies consideradas inferiores

na escala evolutiva, como por exemplo, vírus, bactérias e até mesmo larvas de algumas espécies de crustáceos e peixes.

Com o passar dos anos, tais princípios têm suscitado não apenas importantes regulamentações da matéria em todo o mundo, mas também, outras reflexões sobre o assunto. Destacamos o aspecto contraditório do tema apresentado por Wolfensohm e Lloyd, em 1995. Afirmam-se que a grande justificativa para a tolerância ética com o uso de animais em experimentação é o tanto que eles seriam diferentes dos seres humanos. Entretanto, a validade dos resultados obtidos será tanto mais confiável, quanto mais semelhantes tais organismos forem com a espécie humana (PAIXÃO; SCHRAMM, 1999; DINIZ; GUILHEM, 2002).

Os que defendem o uso racional de animais em estudos experimentais têm produzido vários trabalhos relacionando os princípios que devem nortear tais estudos. Na quase totalidade dos casos, percebe-se que constam basicamente de um esmiuçar do programa 3R's (ANDERSEN et al. 2004; CAZARIN et al., 2004; ALMEIDA; CARLINI, 2006).

No Brasil, a disseminação de comitês de ética em pesquisa nas diversas instituições do país, com exigências cada vez mais rígidas, tem representado um significativo avanço nessa área. Entretanto, muito ainda precisa ser feito no sentido de que o zelo pelo bem-estar animal deixe de ser apenas uma bandeira de movimentos ativistas ou uma mera exigência burocrática a ser cumprida em um projeto de pesquisa e passe a ser um dos principais itens de qualidade na execução experimental.

Em ensaios para avaliação da eficácia e segurança de fitomedicamentos, deve-se considerar não somente os cuidados com os animais de experimentação como também a quantidade do recurso natural a ser explorado como insumo na preparação do medicamento fitoterápico e um eventual risco de escassez.

Os cuidados éticos em experimentação toxicológica já devem começar na escolha da espécie animal a ser usada. Essa decisão depende tanto da substância avaliada quanto do(s) experimento(s) a serem realizados e isso é fundamental para a qualidade dos resultados no estudo toxicológico. Ainda convém considerar, na opção, aspectos diretamente ligados à espécie a ser escolhida como: disponibilidade, facilidade operacional, baixo custo, produção de resultados de fácil mensuração e fidedignos, e principalmente, capacidade preditiva, quer dizer, que seja capaz de antecipar eventos clínicos (ANDREATINI; BOERNGEN-LACERDA; VITAL, 2006).

Apesar de sabermos que não existe uma espécie ideal, é consenso que o rato (*Rattus norvegicus*), animal empregado neste estudo (conforme descrito no item 4.2.2), tem se constituído como o principal em estudos de experimentação toxicológica em função de características como: fácil manejo e observação; baixo custo de manutenção; alta capacidade reprodutiva, período de gestação relativamente curto (21 dias) e ninhada numerosa (geralmente de 8 a 12 animais); volume de fluidos corporais adequado na avaliação de determinados parâmetros; grande número de cepas bem definidas; conhecimentos sobre diversos aspectos de sua biologia que são fundamentais na extrapolação para a condição humana; possibilidade de obtenção de linhagens especiais por meio de seleção genética e mutações as quais são muito úteis em pesquisas específicas (ANDERSEN et al. 2004; NETTO, 2006).

Uma outra espécie animal bastante usada em farmacologia e toxicologia é o cão. Entre os motivos do uso de cães destacamos a recomendação de obras de referência e da exigência da legislação brasileira de que medicamentos fitoterápicos sejam avaliados em pelo menos duas espécies animais (sendo uma não roedora) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)). Ainda pode-se destacar o fácil manejo, a grande disponibilidade e o baixo custo de manutenção desses animais e a

grande semelhança genética com humanos (PARKINSON; GRASSO, 1993, BARBOSA, 2000). Parcerias de instituições de pesquisa com Centros de Controle de Zoonoses podem permitir a utilização de cães SRD (sem raça definida) apreendidos e que antes estavam nas ruas servindo como agentes transmissores de doenças diversas. Todavia, esses animais só podem ser usados após tratamento adequado e ainda se forem submetidos a um rigoroso processo de triagem que selecione os indivíduos para estudo baseado não somente no estado de saúde quanto na observância de critérios de exclusão padronizados.

No que se refere ao desempenho do uso de cães, como segunda espécie em ensaios toxicológicos, não existem estudos específicos com medicamentos fitoterápicos. Avaliações de dados toxicológicos de medicamentos alopáticos e de pesticidas comprovam que os estudos em cães são essenciais na complementação daqueles feitos em roedores e que a duração de 13 semanas é ideal em termos de sensibilidade para efeitos tóxicos ainda não detectados (PARKINSON; GRASSO, 1993; PARKINSON; LUMLEY; WALKER, 1995; GERBRACHT; SPIELMANN, 1998; SPIELMANN; GERBRACHT, 2001).

A seguir, apresentamos os principais testes toxicológicos pré-clínicos *in vivo*, nos aspectos que são consenso entre os autores e, fundamentalmente, naquilo que preconiza a legislação brasileira de medicamentos fitoterápicos (LU, 1992; LARINI, 1993; BRITO, 1994; LAPA et al., 2000; FAUSTMAN; OMENN, 2001; JACOBSON-KRAM; KELLER, 2001; BARROS; DAVINO, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004 b; SÁ; ALMEIDA, 2006).

- Ensaio de Toxicidade Aguda: correspondem a experimentos onde os organismos avaliados são submetidos a uma única dose (ou concentração) da substância (ou produto) avaliada (o) ou então, a doses múltiplas em um período inferior a 24 horas.

Servem para estimar a toxicidade da substância, obter informações preliminares sobre mecanismos de ação e ainda, definir doses a serem usadas em estudos de longa duração.

Tradicionalmente, esses estudos buscavam conhecer a dose (ou concentração) letal mediana (DL_{50} ou CL_{50} , respectivamente). Tal conceito corresponde à dose (ou concentração) capaz de matar a metade de uma população em estudo. A DL_{50} é um parâmetro que tem sofrido várias críticas, inicialmente pelo alto número de animais usados. No Brasil, a regulamentação para determinação desse parâmetro em desenvolvimento de fitoterápicos diz que se use, no mínimo, 6 animais por dose e sexo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004 b). Tal parâmetro ainda é questionado por usar como critério analítico o evento morte que, sem dúvida, é o pior de todos os efeitos tóxicos. Atualmente, em vários países do primeiro mundo, apesar da DL_{50} ainda ser exigida para classificação toxicológica, existe uma tendência em substituí-la por outras avaliações como, por exemplo, o teste da dose fixa. Nesse experimento se busca conhecer a maior dose da substância que não produz morte em um dado grupo experimental (BARROS; DAVINO, 2003).

No teste de dose fixa, trata-se um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) com uma dose inicial de 500 mg/kg de peso corpóreo. Se não houver sinais de toxicidade, a substância não recebe classificação toxicológica, mas o protocolo experimental deve ser repetido com 2.000 mg/kg para avaliação total de riscos. Caso apareça toxicidade sem mortes, com a dose de 500 mg/kg, a substância pode ser classificada como nociva, por correlação estatística com a DL_{50} . Segundo a comunidade européia, nessa categoria estão as substâncias que possuem uma DL_{50} oral para ratos de 200 a 2.000 mg/kg de peso corpóreo (quadro 6). Em caso de morte com 500 mg/kg, repete-se o teste com 50 mg/kg. Se produzir toxicidade sem morte considera-se que a substância é tóxica ($25 \text{ mg/kg} < DL_{50} < 200 \text{ mg/kg}$). Caso haja mortalidade, repete-se o

teste, agora com 5 mg/kg e se houver toxicidade e/ou mortalidade a substância é considerada como muito tóxica ($DL_{50} < 25$ mg/kg) (BARROS; DAVINO, 2003). Esse teste está ilustrado na figura 3.

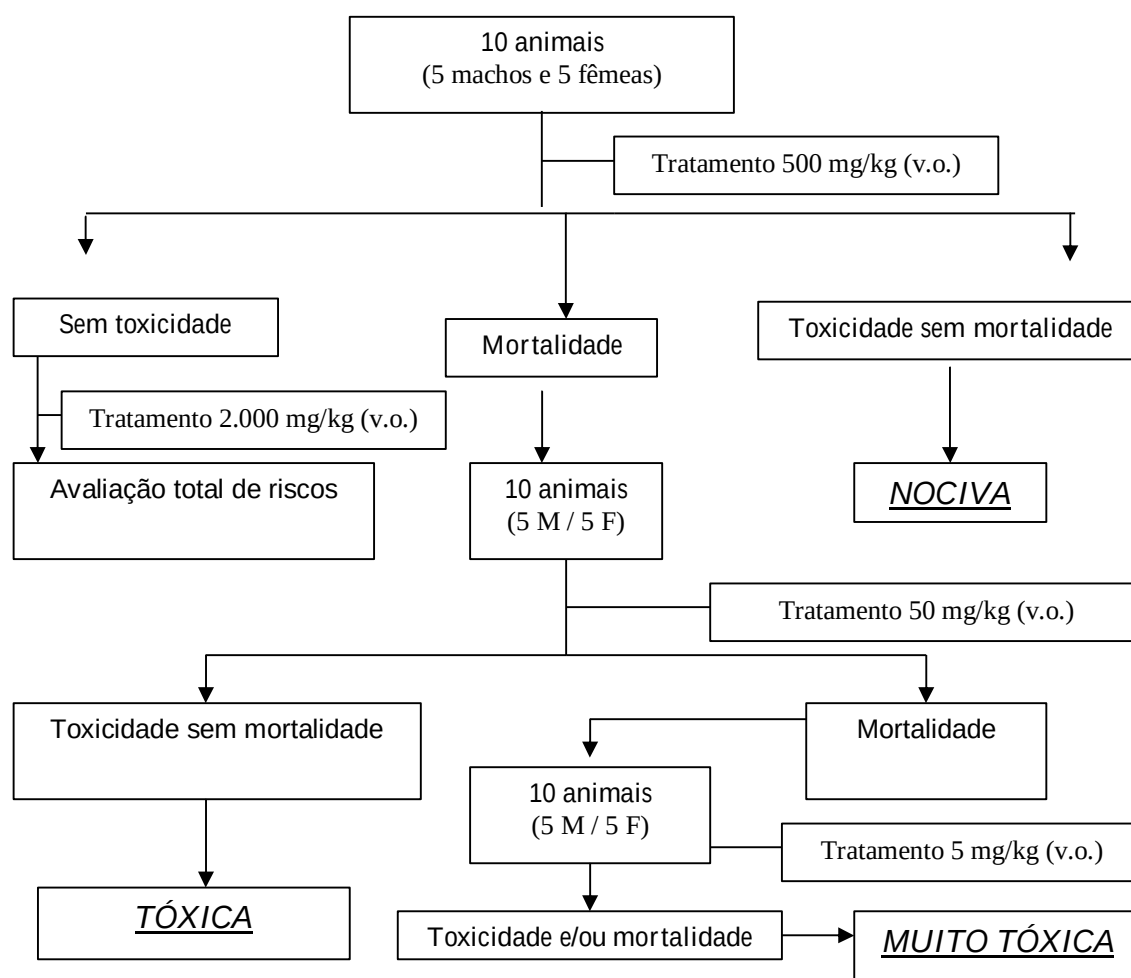


Figura 3. Fluxograma do Teste da Dose Fixa.

Categoria (CE*)	DL ₅₀	Toxicidade sem morte
Muito tóxica	< 25 mg/kg	5 mg/kg
Tóxica	25 – 200 mg/kg	50 mg/kg
Nociva	200 – 2.000 mg/kg	500 mg/kg

Quadro 6. Classificação toxicológica comparativa (DL₅₀ e Teste da dose fixa).

Legenda: *CE: comunidade européia. Fonte: Barros e Davino (2003).

Neste mesmo intento, vários estudos têm demonstrado ser possível caracterizar uma correlação substancial entre as doses máximas toleradas de várias substâncias químicas, com potencial toxicológico, em diferentes espécies animais. Tal fato aponta para uma grande probabilidade desse conceito ser útil no estabelecimento de

uma “dose-limite” de toxicidade em humanos para determinada substância em estudo (GREAVES; WILLIAMS; EVE, 2004).

Apesar disso, a legislação brasileira para avaliação da toxicidade pré-clínica aguda de medicamentos fitoterápicos preconiza que seja feita uma estimativa da DL_{50} . Estabelece o uso de, no mínimo, 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) por grupo, além de outras especificações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004b).

Além da insistência com a DL_{50} como principal parâmetro para avaliação de toxicidade aguda, a norma brasileira não estabelece um valor máximo de dose para esses experimentos chegando a afirmar que “... se não forem observados efeitos adversos, [deve-se] utilizar a dose máxima possível”. Essa recomendação não está em sintonia com as atuais preocupações em bioética animal. Mesmo os que preconizam o uso da DL_{50} o fazem, na grande maioria, até o limite experimental da dose de 2.000 mg/kg por considerarem que, acima disso, tanto a exposição seria muito alta e improvável de acontecer em seres humanos, quanto as alterações orgânicas seriam atribuídas ao fato do organismo em estudo ficar descompensado e não estariam ajudando a conhecer a toxicidade da substância.

- Ensaio de Toxicidade Subcrônica: realizados em um período de 21 a 90 dias de exposição à substância avaliada. Informa sobre a toxicidade após exposições repetidas e ainda orienta sobre: níveis da substância que não produzem efeito tóxico; principais órgãos-alvo ou sistemas atingidos; ocorrência de efeitos tardios devido a capacidade de acumulação orgânica e, ainda, sobre a reversibilidade do efeito tóxico. A via de administração deve ser aquela pretendida para uso, ou aquela de provável exposição. A observação dos animais deve acontecer pelo menos uma vez por dia. Devem ser conduzidos em pelo menos 2 espécies, sendo uma não roedora e com pelo

menos 3 doses. Os principais parâmetros avaliados são: sinais tóxicos gerais; alterações na ingestão de água e alimentos bem como na evolução ponderal; exames de urina e de sangue (hematológicos e bioquímicos); avaliação anatomopatológica e comportamental.

- Ensaio de Toxicidade Crônica: seguem as mesmas características dos protocolos da avaliação subcrônica, com a diferença de que são realizados em períodos superiores a 3 meses. Outro diferencial é a sua aplicabilidade para detecção de efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, desde que as doses experimentais tenham sido adequadamente selecionadas. Esses ensaios são realizados em um tempo correspondente ao tempo médio de vida da espécie animal.

Em relação aos estudos toxicológicos pré-clínicos de longa duração (toxicidades subcrônica e crônica), a legislação brasileira para fitoterápicos distingue dois tipos de estudos: os de 4 semanas, para produtos a serem usados por, no máximo, 30 dias por ano e os estudos de 12 semanas, para os medicamentos com proposta de uso acima de 30 dias por ano. Estabelece que o produto deva ser testado em pelo menos 2 espécies de mamíferos, sendo uma de roedor (5 animais por dose e sexo) e outra de não-roedor (3 animais por dose e sexo) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004 b). Destaque-se ainda, a realização de exames histopatológicos em vísceras como de suma importância por fornecerem suporte aos dados eventualmente encontrados em órgãos e/ou sistemas específicos.

Além dos estudos agudo e de longa duração, a Resolução Específica nº 90 da ANVISA (RE 90) requer outros testes toxicológicos para registro de medicamentos fitoterápicos, a saber: estudos especiais de genotoxicidade para produtos com indicação de uso contínuo ou prolongado em humanos e estudos de sensibilização dérmica, irritação cutânea e irritação ocular para fitoterápicos de uso tópico (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)).

É possível acrescentar-se aos experimentos já citados, outras possibilidades para avaliação de toxicidade pré-clínica. Os estudos toxicocinéticos que, ao informarem sobre o percurso da substância no organismo, nos ajudam a conhecer os órgãos-alvo de determinado toxicante. Também os estudos sobre a ecotoxicidade do produto, considerando que um dano a qualquer integrante do meio ambiente pode redundar, embora indiretamente, em prejuízo ao homem. Ensaio específicos, compreendidos como experimentos que objetivam a identificação de um efeito biológico definido, são importantes quando se sabe da capacidade da substância em produzir tal efeito, ou ainda pela sua semelhança estrutural com outras que tenham tal toxicidade. Entre estes, além da genotoxicidade (mutagênese) e irritação dérmica e ocular, já citados, incluímos os carcinogênicos não genotóxicos (BARROS; DAVINO, 2003).

Em uma direção nova e na perspectiva de revolucionar os estudos de avaliação de toxicidade, surge a Toxicogenômica. Essa ciência se ocupa, basicamente, de três tipos de alterações gênicas relacionadas com a exposição a substâncias químicas: modificações na expressão de RNA mensageiro; na expressão de proteínas celulares ou tissulares (proteômica) e em perfis metabólicos (metabonômica). Correlações entre tais alterações com a exposição à xenobióticos, poderiam gerar uma “assinatura ou digital toxicológica” para determinada substância (ou grupo). Apesar das inúmeras possibilidades de aplicação, grandes desafios surgem para que tais tecnologias sejam incorporadas por agências regulatórias, como por exemplo, como se daria a padronização de parâmetros de qualidade para tais experimentos? Sendo assim, por enquanto, convém integrar essas novas tecnologias a testes clássicos para aumentar a eficiência do processo de avaliação de risco químico (POGNAN, 2004; BATTERSHILL, 2005; OBEREMM; ONYON; GUNDERT-REMY, 2005; REYNOLDS, 2005; ROBERTSON, 2005).

Todavia, mesmo que determinado produto (ou substância) não apresente efeitos tóxicos significativos durante os estudos toxicológicos pré-clínicos ele ainda não poderá ser recomendado para uso pela população. Deve-se, a partir de então, proceder aos estudos toxicológicos clínicos, ou seja, aqueles realizados em humanos voluntários. Apesar de não ser assunto deste trabalho, convém ressaltar alguns pontos deste tema, tanto pela sua importância na promoção da saúde humana, quanto pela necessidade de ser conduzido sob elevado rigor técnico e ético. A avaliação de eventual toxicidade clínica, em se tratando de medicamentos, se dá simultânea à observação do desempenho farmacoterapêutico do produto.

A legislação brasileira que regulamenta os estudos toxicológicos clínicos com produtos fitoterápicos estabelece que os mesmos devam ser realizados em condições médicas controladas, com voluntários sadios em um número mínimo de 14 por grupo sendo todos submetidos a exames clínicos e laboratoriais. O período de administração do produto deve ser de 7 dias em estudos agudos e de 8 a 12 semanas para avaliação de toxicidade crônica, essa, para produtos em que a utilização recomendada será de 3 ou mais dias por semana. Tais estudos devem ocorrer dentro do contexto geral dos estudos clínicos para avaliação de eficácia do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 1996).

A pesquisa em humanos, com vistas ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos, deve ocorrer em quatro 4 etapas ou fases, conforme a regulamentação brasileira. Em cada uma dessas fases, alguns aspectos vão mudando como, por exemplo, o número de pacientes utilizados que vai aumentando progressivamente. Outro exemplo são os parâmetros avaliados em cada organismo que, à medida que se passa de uma fase a outra, se tornam mais complexos tornando o estudo da eficácia do produto mais específico em relação ao efeito que o medicamento se propõe a causar no organismo.

A fase I corresponde ao primeiro estudo em seres humanos com um novo princípio ativo ou formulação. Deve ser feita em pequenos grupos de voluntários objetivando conhecer preliminarmente aspectos de segurança, perfil farmacocinético e, quando possível, aspectos farmacodinâmicos. A fase II, também conhecida como estudo terapêutico piloto, visa a demonstrar a atividade e segurança em curto prazo do princípio ativo avaliado em pacientes portadores de determinada enfermidade. Realiza-se também em pequenos grupos e deve estabelecer relações dose-resposta. A fase III, ou estudo terapêutico ampliado, corresponde às pesquisas realizadas em grandes e variados grupos de voluntários com o intuito de avaliar a relação risco / benefício a curto e longo prazos, bem como o valor terapêutico relativo do produto. Aqui é dada especial atenção às reações adversas mais freqüentes, interações medicamentosas relevantes e aspectos capazes de alterar o efeito do medicamento. Na fase IV temos as pesquisas realizadas depois de comercializado o produto ou a especialidade medicinal. Constam de estudos pós-comercialização para estabelecer o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas bem como a confirmação da freqüência de surgimento daquelas já conhecidas e, ainda, as estratégias de tratamento.

Cabe lembrar que em qualquer pesquisa clínica, existe a obrigatoriedade de que os voluntários tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido e a necessidade de se maximizar o número de parâmetros avaliados em cada paciente (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1978; CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1997; LAPA et al., 2000; ZANINI; CARVALHO, 2001).

Como se pode observar, a avaliação de toxicidade, principalmente de medicamentos fitoterápicos, é um processo muito importante na promoção do uso racional de tais produtos. Entretanto, deve ser planejada e conduzida de modo otimizado a fim de obterem-se os melhores resultados possíveis sem desperdício de recursos.

Nessa perspectiva, e por tudo já exposto sobre a espécie vegetal em questão, foi que desenvolvemos o presente estudo toxicológico pré-clínico com a espécie *Jatropha gossypifolia* L., com a intenção de contribuir para o uso racional dessa planta e, conseqüentemente, promover a saúde e a qualidade de vida da nossa população.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver um estudo toxicológico pré-clínico com extrato etanólico de folhas e caule de *Jatropha gossypifolia* L. (pião-roxo), com base na Resolução 90/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)).

3.2 Específicos:

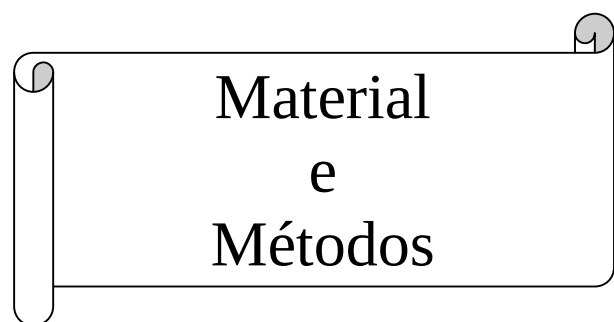
a) Realizar uma revisão bibliográfica para a avaliação de toxicidade da *Jatropha gossypifolia* L. a fim de nortear o presente estudo.

b) Obter o extrato etanólico de partes aéreas (folhas e caules) de *Jatropha gossypifolia* L. de modo padronizado e usá-lo como objeto de estudo toxicológico.

c) Avaliar as toxicidades aguda e crônica do extrato etanólico de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos Wistar mediante a observação, nesses animais, de alterações qualitativas e/ou quantitativas em parâmetros metabólicos, bioquímicos, hematológicos e anatomopatológicos.

d) Avaliar a capacidade do extrato etanólico de *Jatropha gossypifolia* L. em alterar a atividade exploratória e motora de ratos Wistar sob tratamento prolongado com esse extrato.

Capítulo II



4. MATERIAL E MÉTODOS

Nesse item descreveremos aspectos relacionados à parte experimental do presente estudo. Relacionamos tanto os locais onde as diversas atividades foram realizadas, quanto o material empregado e, ainda, o modo como cada protocolo experimental foi conduzido.

4.1 Locais da pesquisa

As atividades desta pesquisa foram desenvolvidas nos seguintes locais:

- Áreas rurais do município de Santa Rita (PB).
- Herbário “Lauro Pires Xavier” do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba (LTF-UEPB).
- Laboratórios de Química de Produtos Naturais e Laboratório de Ensaio Toxicológicos (LABETOX) do LTF-UEPB
- Biotério “Prof. Thomas George” do LTF-UEPB.
- Laboratórios de Análises Clínicas e Patologia Clínica do Hospital Universitário “Lauro Wanderley” (HULW) da UEPB.

4.2 Material

Os materiais utilizados para a pesquisa foram de naturezas distintas como vegetal e animal, além de soluções, reagentes e aparelhagens.

4.2.1 Material Botânico

As amostras de partes aéreas do vegetal (caule e folhas) foram coletadas em áreas urbanas do município de Santa Rita (PB) no período entre os meses de junho a agosto do ano de 2004 e identificadas pela Prof^a Dr^a Maria de Fátima Agra, do Herbário “Lauro Pires Xavier” (LTF-UFPB). No referido herbário, encontra-se uma amostra representativa da espécie registrada sob código Agra & Góis 4192 (JPB).

4.2.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, albinos (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, pesando entre 250 a 350 g (machos) e entre 150 a 250 g (fêmeas, nulíparas e não grávidas), fornecidos pelo Biotério “Prof. Thomas George” do LTF-UFPB.

Os animais, ao longo do trabalho, encontraram-se agrupados em gaiolas de polietileno (cinco animais por gaiola, conforme ilustrado na figura 4) e mantidos sob condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C), com livre acesso à comida (*pellets* de ração Purina ®) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno com bicos de vidro. A ração e as garrafas com água eram colocadas nas grades metálicas na parte superior das gaiolas. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, ou seja, de 6h às 18h (claro) e de 18h às 6h (escuro). Antes da realização de qualquer experimento, os animais eram colocados no ambiente de trabalho com antecedência mínima de 1 hora à execução do protocolo experimental.

A utilização dos animais obedeceu a princípios técnicos e éticos (ANDERSEN et al., 2004; COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO

ANIMAL, 2004). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/CCS/UFPB mediante certidão de nº 0105/06.



Figura 4. Imagem de ratos Wistar agrupados em gaiola de polietileno.

4.2.3 Soluções e Reagentes

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido Sílico-Túngstico

Água destilada

Água potável

Álcool etílico P.A.

Álcool etílico (95%)

Álcool etílico diluído (46°)

Ácido úrico (kit reagente Labtest®)

Albumina (kit reagente Labtest®)

Amilase (kit reagente Labtest®)

Bilirrubina total (kit reagente Labtest®)

Cloreto Férrico 2 %

Colesterol total (kit reagente Labtest®)

Creatinina (kit reagente Labtest®)

Creatinafosfoquinase (kit reagente Labtest®)

Extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L.

Formol (10 %)

Fosfatase alcalina (kit reagente Labtest®)

Gama glutamil transpeptidase (kit reagente Labtest®)

Gelatina 0,5 %

Glicose (kit reagente Labtest®)

Hematoxilina- Eosina

Lactato-desidrogenase (kit reagente Labtest®)

Magnésio (kit reagente Labtest®)

Parafina

Proteínas totais (kit reagente Labtest®)

Reativo do biureto

Solução reagente de Bouchardt

Solução reagente de Dragendorff

Solução reagente de Mayer

Solução reagente para Esteróides

Solução reagente para Saponinas

Transaminases (kit reagente Labtest®)

Tricômico de Mason

Triglicerídeos (kit reagente Labtest®)

Uréia (kit reagente Labtest®)

Vaselina

Xilol

4.2.4 Aparelhagem

- Analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus® - Roche *Diagnostic System*), para determinações bioquímicas no soro.
- Analisador de íons seletivos (Iselab®), para determinações dos íons sódio, potássio e cálcio.
- Analisador hematológico celular automático (Cobas Argos 50® - Roche *Diagnostic System*) para realização do hemograma e contagem de plaquetas.
- Balança analítica (AID – HR – 120g – Japão).
- Balança eletrônica (BG – 8000 GEHAKA).
- Centrífuga (BIO ENG® BE 4000) para separação de soro (3500 rpm durante 10 minutos).
- Glicosímetro (ADVANTAGE® *Boehringer Mannheim*) para monitorar glicemia com fitas reativas.
- Cronômetro.
- Sistema automático (HEMATEL 200®) para corar células sangüíneas.
- Microscópio Olympus® para confirmação e controle da contagem diferencial de células sangüíneas.
- Microscópio (RML5® *Askmania-Germany*), utilizado nas análises histopatológicas.

- Sistema de Campo Aberto (*Open Field*). Fabricado no LTF/UFPB e semelhante ao descrito por Broadhurst (1960) com as adaptações descritas por Moraes, Barbosa-Filho e Almeida (1998) para avaliação da atividade exploratória dos animais.
- *Rota Rod* (7750® - Hugo Basile – Itália) para avaliação da capacidade motora dos animais.
- Termômetro digital (MC-3BC® - OMRON – China) para avaliação da temperatura colônica dos animais.

4.3 Metodologia

A seguir, descreveremos a metodologia utilizada para o desenvolvimento da pesquisa.

4.3.1 Obtenção do extrato etanólico de *Jatropha gossypifolia* L

O extrato vegetal foi preparado no Laboratório de Química de Produtos Naturais do LTF-UFPB. As folhas e caules foram desidratados, separadamente, em estufa com ar circulante, a 38°C, por aproximadamente 72 horas e triturados (ainda separadamente) em moinho tipo Harley. Depois de triturados, foram misturados e macerados em etanol (95%) à temperatura ambiente por aproximadamente 72 horas. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado à vácuo em rotaevaporador, obtendo-se o Extrato Etanólico (EE). A determinação do peso seco desse extrato foi feita pelo método gravimétrico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Antes dos experimentos e a partir do peso seco, o EE era diluído com água de modo a se obter soluções em concentrações adequadas para a administração correta das doses. Procedeu-se ainda uma triagem fitoquímica no EE para identificação semi-quantitativa de alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas e taninos (MATOS, 1997).

4.3.2 Estudo toxicológico pré-clínico agudo

Os protocolos experimentais para avaliação da toxicidade aguda foram orientados principalmente pela Resolução Específica (RE 90/2004) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Mas também por obras de referência e pela padronização prévia realizada no Biotério do LTF-UFPB (LARINI, 1993; MELO-DINIZ, 2000; FAUSTMAN; OMENN, 2001; JACOBSON-KRAM; KELLER, 2001; BARROS; DAVINO, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)).

4.3.2.1 Tratamento dos animais

Os animais foram tratados por gavagem inicialmente com a dose de 5 g/kg do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (n=6 por dose e sexo) para estimativa da ocorrência de mortes. Posteriormente, outros grupos de animais foram tratados com doses inferiores à 5 g/kg e espaçadas geometricamente, a saber: 1,2 g/kg; 1,8 g/kg; 2,7 g/kg e 4,0 g/kg (n= 6 animais por dose e por sexo). Foi feito um grupo controle também com 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) em que os animais foram tratados com água, veículo de ressuspensão do extrato.

4.3.2.2 Triagem farmacológica e comportamental e letalidade

Durante 14 dias após o tratamento pesquisou-se, em todos os grupos experimentais, o surgimento de sinais tóxicos gerais usando-se a metodologia proposta por Almeida et al. (1999) a fim de se identificar eventuais alterações sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Autônomo (SNA). A observação destes sinais ocorreu aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez por dia, sempre no mesmo horário, por volta de 8 horas da manhã, nos 13 dias seguintes. O quadro 7 mostra o protocolo utilizado.

Além desses parâmetros, também foi registrada a ocorrência de mortes. Ainda foi feita a análise macroscópica das vísceras dos animais que morreram ao longo deste período de observação.

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos				
	(0) sem efeito. (-) efeito diminuído. (+) efeito presente. (++) efeito intenso				
	Até 30 min.	1 h	2 h	3 h	4 h
1-SNC					
a) Estimulante					
Hiperatividade					
Iritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outros _____					
b) Depressora					
Hipnose					
Ptose					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuída					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c) Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2- SNA					
Diarréia					
Constipação					
Defecação aumentada					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3-MORTE					

Observações complementares:

Responsável Técnico

Quadro 7. Protocolo utilizado na triagem farmacológica e comportamental.

4.3.2.3. Evolução ponderal e consumo de água e alimentos

Os animais foram pesados tanto no primeiro dia, para administração das doses do extrato, quanto nos demais dias do período de observação. Para construção da curva de evolução ponderal, foram utilizadas as médias diárias dos pesos dos animais de cada grupo ($n = 6$ por dose e sexo).

O consumo de água foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento (dia zero) disponibilizando-se mamadeiras graduadas cheias e registrando-se, no dia posterior, o volume ingerido pelos animais. O consumo de alimentos (ração na forma de *pellets*) também foi avaliado a partir do primeiro dia após o tratamento, pesando-se a ração disponibilizada diariamente para os animais e contabilizando-se, no dia seguinte, o peso consumido de ração.

4.3.2.4 Análise laboratorial de sangue.

Após os 14 dias de observação, os animais sobreviventes dos grupos controle e tratados foram submetidos a jejum de 12 horas. No décimo quinto dia após o tratamento, foi retirado sangue através do plexo braquial de três animais de cada grupo (adequadamente anestesiados com éter). O sangue de cada animal foi colocado em tubos (devidamente identificados) contendo EDTA (anticoagulante) para realização de exames hematológicos e em tubos com gel separador (*Microtainer Becton Dickson*) para obtenção de soro usado nas determinações bioquímicas.

Em se tratando de parâmetros hematológicos, foram analisados na série vermelha (eritrograma): contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da

hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM) e da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM). No leucograma (série branca) foram avaliados: contagem global e diferencial de leucócitos. Nessa avaliação hematológica foi utilizado o analisador celular COBAS ARGOS 50® (ROCHE). Os esfregaços sangüíneos foram corados automaticamente no HEMATEL 200 e analisados em microscópio (Olympus) para confirmação de contagem diferencial de células.

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados por métodos diferentes. Por métodos enzimáticos foram determinados: glicose, uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídios e ácido úrico. Por métodos cinéticos: transaminases (AST e ALT), amilase e fosfatase alcalina. Pelo método do biureto, foi determinado o teor de proteínas totais e albumina. Essas determinações foram feitas utilizando-se o analisador bioquímico automático COBAS MIRA PLUS® (ROCHE). As análises de sódio e potássio foram realizadas pelo analisador de íons seletivos ISELAB, utilizando-se o método do eletrodo íon seletivo (MILLER, 1992).

4.3.2.5 Estudo anatomopatológico.

No décimo quinto dia de observação, dois animais de cada um dos grupos referidos anteriormente (cf. 4.3.2.4) foram sacrificados por tração cervical. As vísceras foram retiradas e examinadas macroscopicamente, com ressecção e consecutiva pesagem. O coração, fígado e rins foram seccionados por incisão sagital e os pulmões submetidos à perfusão via traquéia, com solução de formol a 10%. As secções teciduais dos órgãos excisados fixados em formalina (formol a 10%) tamponada, após 24 horas, foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries

crescentes de álcool (70° a 100°) seguida de diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais (MICHALANY, 1998). Em micrótomo, os fragmentos tissulares foram seccionados em espessura de 3,0 µm com subsequente coloração por hematoxilina-eosina e tricômico de Masson e examinados ao microscópio óptico.

4.3.3 Estudo toxicológico pré-clínico crônico

Os protocolos experimentais para avaliação da toxicidade crônica foram orientados principalmente pela RE 90/2004 da ANVISA. Mas também por obras de referência e pela padronização prévia realizada no Biotério do LTF-UFPB (LARINI, 1993; MELO-DINIZ, 2000; FAUSTMAN; OMENN, 2001; JACOBSON-KRAM; KELLER, 2001; BARROS; DAVINO, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)).

4.3.3.1 Tratamento dos animais

Os animais utilizados foram distribuídos em 4 grupos contendo 20 animais cada (10 machos e 10 fêmeas), sendo 3 grupos de animais tratados e um grupo controle. O grupo controle foi tratado com água, veículo de ressuspensão do extrato. Aos 3 grupos de animais tratados foram administradas via oral (gavagem) 3 diferentes doses (uma para cada grupo) do EE de *Jatropha gossypifolia* L., diariamente durante 13 semanas. As doses utilizadas foram: 45 mg/kg; 135 mg/kg e 405 mg/kg.

Além desses 4 grupos, foram feitos mais 2 outros grupos chamados satélites e com 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas) com o intuito de avaliar, através da

análise de alguns parâmetros, a reversibilidade dos eventuais efeitos tóxicos e/ou o surgimento de efeitos tardios produzidos pelo extrato nas duas maiores doses (135 mg/kg e 405 mg/kg). Os animais do grupo satélite foram tratados com as referidas doses, também durante 13 semanas. Depois de 30 dias do término do tratamento, procedeu-se de modo semelhante ao feito com os animais dos grupos tratados e controle (como descrito a seguir) no que diz respeito à coleta de sangue para realização de exames bioquímicos e hematológicos, bem como ao sacrifício de 40% dos animais de cada grupo para realização de exames histopatológicos de vísceras.

Durante o tratamento e ainda após o término desse, foram avaliados diversos parâmetros, conforme descrito a seguir.

4.3.3.2 Parâmetros avaliados durante o tratamento.

Esses parâmetros subdividem-se entre aqueles avaliados diariamente e aqueles avaliados quinzenalmente.

4.3.3.2.1 Parâmetros avaliados diariamente

Todos os dias os animais foram avaliados no que diz respeito à triagem farmacológica e comportamental, ocorrência de mortes, evolução ponderal e consumo de água e alimentos.

a) Triagem farmacológica e comportamental e letalidade

Durante o período do tratamento, observou-se o surgimento de sinais tóxicos gerais usando-se a metodologia proposta por Almeida et al. (1999), conforme já descrito no tratamento agudo (cf. 4.3.2.2) e apresentado no Quadro 7. A observação desses sinais ocorreu aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos no primeiro dia e uma vez por dia, sempre no mesmo horário (8 horas da manhã), nos demais dias ao longo de 13 semanas. Também foi registrada a ocorrência de mortes e feita a análise macroscópica das vísceras dos animais que morreram ao longo desse período de observação.

b) Evolução ponderal, consumo de água e alimentos.

Esses parâmetros foram avaliados conforme já descrito para o tratamento agudo (cf. 4.3.2.3). Os animais foram pesados todos os dias, a partir do primeiro dia, para administração das doses do extrato e nos demais dias do período de observação. Os consumos de água e ração foram avaliados diariamente a partir do segundo dia de tratamento. Para construção das curvas de evolução ponderal e de consumo de água e alimentos, foram utilizadas as médias semanais obtidas a partir das médias diárias dos

valores de cada parâmetro para cada grupo (n=10 por dose e sexo, exceto nos satélites onde n=5 por dose e sexo).

4.3.3.2.2 Parâmetros avaliados quinzenalmente

A cada quinze dias, os parâmetros avaliados foram: temperatura colônica, glicemia caudal e os testes de campo aberto e *rota rod*.

a) Temperatura colônica

A temperatura corporal foi medida com auxílio de um termômetro digital (modelo MC – 3B – ORON / China), lubrificado com vaselina a fim de ser introduzido, cerca de 5 cm, pelo reto até atingir o cólon do animal. Esse procedimento foi realizado quinzenalmente em todos os animais durante o período de tratamento.

b) Glicemia caudal

Os ratos, sob jejum prévio de 12 horas, eram imobilizados em contêntores plásticos e uma gota de sangue, coletada da veia caudal mediante corte, era colocada em fita reativa para dosagem de glicose e a leitura realizada em monitor de glicemia (marca *Advantage-Boehringer Mannheim*). A determinação da glicemia era feita em todos os animais quinzenalmente, na semana em que não se media a temperatura.

c) Teste do campo aberto (*open field*)

Esse experimento foi realizado para avaliação de alterações comportamentais mediante o uso do aparelho de campo aberto proposto por Carlini et al. (1986). Avaliou-se a atividade exploratória dos animais mediante sua movimentação espontânea (ambulação), registrada pelo número de vezes que cruza, com as quatro patas, as divisões do campo e também o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*), de levantar (*rearing*) e o número de bolos fecais como índice de emocionalidade. Essas avaliações se deram quinzenalmente, sendo que todos os animais participantes desse experimento (metade de cada grupo) foram avaliados em um mesmo dia. Cada animal foi observado durante 3 minutos, sendo que o experimento se iniciava sempre uma hora após os animais receberem a dose do extrato (MANSUR; MARTZ; URLINI, 1971).

d) Teste *Rota Rod*

Esse experimento foi realizado quinzenalmente, para avaliação de alterações motoras e iniciado uma hora após o tratamento dos animais com o extrato de acordo com o item 4.3.3.1. Os animais utilizados corresponderam à metade que não foi avaliada no campo aberto. Os animais eram colocados na barra giratória do aparelho de *Rota-Rod* com velocidade constante de 9,0 rpm, sendo registrado o tempo de permanência no referido aparelho, utilizando-se três reconduções do teste (DUNHAM; MIYA, 1957; MORAIS; BARBOSA-FILHO; ALMEIDA, 1998), conforme ilustrado na figura 5.

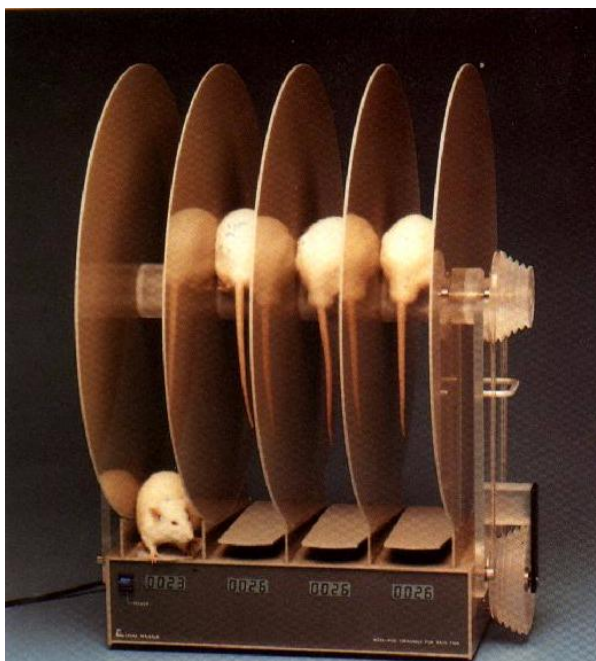


Foto: Laboratório de Psicofarmacologia (LTF-UFPB)

Figura 5. Imagem de ratos sob o experimento de *Rota Rod*.

4.3.3.3 Parâmetros avaliados após o tratamento

A análise laboratorial de sangue e o estudo anatomopatológico correspondem aos parâmetros avaliados após o tratamento.

4.3.3.3.1 Análise laboratorial de sangue

Após as 13 semanas de realização do experimento de avaliação de toxicidade crônica, foram coletadas amostras de sangue, através de sangria do plexo braquial, de 40% dos animais sobreviventes (e sob 12 horas de jejum) dos grupos tratados com o extrato (nas doses de 45 mg/kg, 135 mg/kg e 405 mg/kg) e do grupo controle. Os animais do grupo satélite tiveram seu sangue coletado 30 dias após o término do tratamento crônico, conforme já relatado. Os procedimentos de coleta foram os mesmos utilizados durante o estudo toxicológico agudo (cf. 4.3.2.4).

Em se tratando de exames hematológicos, foram analisados os mesmos parâmetros descritos no estudo agudo, acrescentando-se a contagem de plaquetas

também pelo analisador celular COBAS ARGOS 50® (ROCHE). Além dos parâmetros bioquímicos já descritos no estudo toxicológico agudo, também foram realizadas as seguintes determinações: globulina (biureto); bilirrubina total (enzimático); gama glutamil transpeptidase, creatinafosfoquinase e lactato-desidrogenase (método cinético); cálcio e magnésio (analisador de íons seletivos ISELAB) (MILLER, 1992).

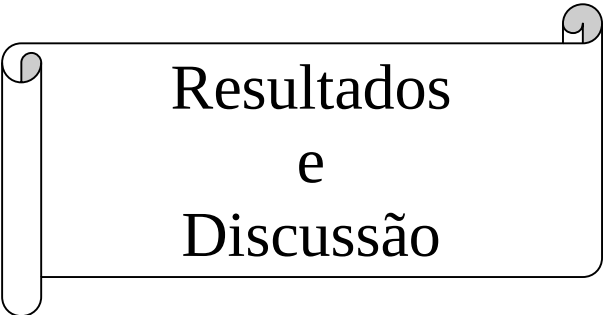
4.3.3.3.2 Estudo anatomopatológico

Também ao final do tratamento crônico, os animais referidos anteriormente (cf. 4.3.3.3.1) foram sacrificados por tração cervical (40% de cada grupo) e tiveram suas vísceras coletadas para realização do estudo anatomopatológico de modo semelhante ao relatado no estudo agudo, conforme descrito em 4.3.2.5. Os animais dos grupos satélites foram sacrificados 30 dias após o término do tratamento crônico, conforme já relatado.

4.3.4 Análise estatística

Os resultados numéricos foram expressos em média aritmética ($\pm$ erro padrão da média). As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA), seguida, quando detectada diferença, pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. As análises foram feitas com auxílio do programa *GraphPad Prism* 3.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (GOMES, 1985; GAD; WEIL, 1989; GRAPHPAD PRISM, 2004).

Capítulo III



Resultados
e
Discussão

5. RESULTADOS

Nesse item descreveremos todos os resultados obtidos nessa pesquisa.

5.1 Características do Extrato Etanólico de *Jatropha gossypifolia* L.

O EE obtido apresentou-se como um resíduo escuro, viscoso e higroscópico (rendimento: 7,9 %). A triagem fitoquímica confirmou a presença de taninos, esteróides e flavonóides, conforme ilustrado no quadro 8.

Grupo Químico	Avaliação semi-quantitativa*
Alcalóides	-
Esteróides	++
Flavonóides	++
Saponinas	-
Taninos	+++

Quadro 8. Resultado da triagem fitoquímica com o EE de *Jatropha gossypifolia* L.

*Legenda: (-) negativo; (+) fracamente positivo; (++) positivo; (+++) fortemente positivo (MATOS, 1997)

5.2 Estudo toxicológico pré-clínico agudo

A seguir, apresentam-se os resultados de parâmetros avaliados durante 14 dias após o tratamento de ratos machos e fêmeas com o EE de *Jatropha gossypifolia* L., nas doses de 1,2 g/kg, 1,8 g/kg, 2,7 g/kg, 4,0 g/kg e 5,0 g/kg, além de grupos controles.

5.2.1 Triagem farmacológica e comportamental

Entre os animais que receberam a menor dose (1,2 g/kg), não foram observadas alterações orgânicas dignas de nota, assim como nos animais do grupo controle.

Em relação aos animais tratados com dose igual ou superior a 1,8 g/kg, logo nas primeiras 4 horas após o tratamento, foram observados alguns sinais gerais de toxicidade que são apresentados no Quadro 9: piloereção; sedação; contorções abdominais e aumento da evacuação. A partir do terceiro dia, além da manutenção de piloereção e sedação entre os animais tratados com as duas maiores doses, surgiram em todos os animais: comportamento estereotipado de autolimpeza (*grooming*); agrupamentos discretos; dispnéia e ptose palpebral. Estes efeitos ocorreram em ambos os sexos e foram tanto mais intensos e freqüentes, quanto maior a dose. A perda gradativa de peso e a paralisia do trem posterior foram sinais anteriores ao óbito.

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos do EE (g/Kg)									
	(0) sem efeito. (-) efeito diminuído. (+) efeito presente. (++) efeito intenso									
	Até 4 h após o tratamento					A partir do terceiro dia após o tratamento				
	GC	1,8	2,7	4,0	5,0	GC	1,8	2,7	4,0	5,0
1-SNC										
a) Estimulante										
Piloereção	0	+	+	++	++	0	-	-	+	+
b) Depressora										
Ptose	0	0	0	0	0	0	+	+	++	++
Sedação	0	+	+	++	++	0	-	-	+	+
c) Outros comportamentos										
Agrupamentos	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+
Dispneia	0	0	0	0	0	0	+	+	++	++
Limpeza	0	0	0	0	0	0	+	+	++	++
Contorções abdominais	0	+	+	++	++	0	0	0	0	0
2- SNA										
Defecação aumentada	0	++	++	++	++	0	0	0	0	0

Quadro 9. Triagem farmacológica e comportamental no estudo toxicológico pré-clínico agudo (dose $\geq 1,8$ g/kg, v.o. com o EE de *Jatropha gossypifolia*).

*Legenda: GC: grupo controle

5.2.2 Evolução ponderal, consumo de água e alimentos

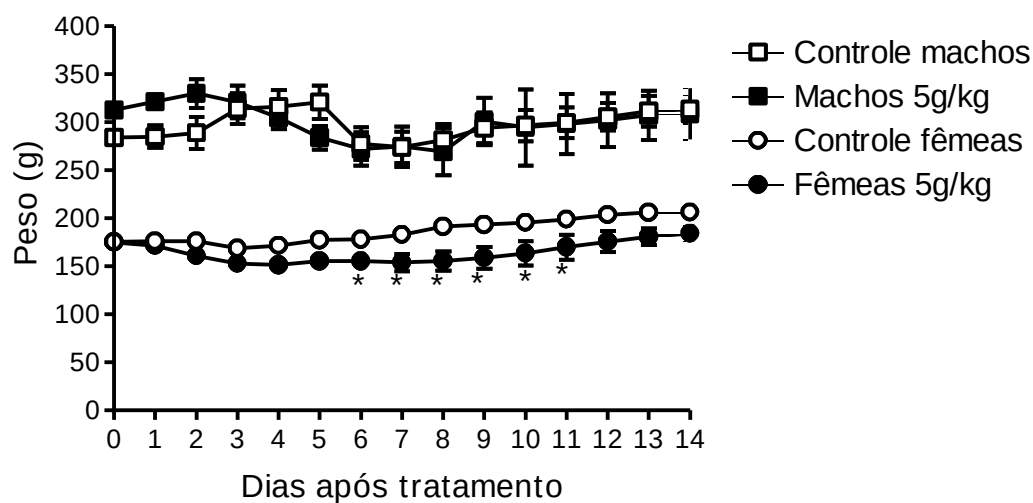
A evolução ponderal foi significativamente reduzida apenas em fêmeas que receberam a maior dose experimental (5 g/kg) (tabela 1 e gráfico 1). Não houve diferenças significativas entre animais dos grupos tratados e controle em relação ao consumo de água (tabela 2). Somente nos machos sobreviventes da maior dose (5 g/kg), o extrato administrado reduziu de modo significativo o consumo de alimentos (tabela 3 e gráfico 2).

Tabela 1. Evolução ponderal diária de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de *Jatropha*

Grupos	Dias após o tratamento												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Machos (g)</i>													
Controle	285,3 ±11,9	289,0 ±16,5	314,2 ±16,1	316,6 ±17,0	321,1 ±17,1	277,7 ±16,9	274,1 ±16,1	281,8 ±16,5	294,3 ±15,9	296,7 ±16,1	299,8 ±16,0	305,8 ±14,3	311,1 ±15,1
1,2 g/kg	265,5 ±5,7	269,7 ±4,8	302,8 ±5,1	279,7 ±5,4	286,9 ±5,4	233,0 ±6,5	239,9 ±8,4	241,8 ±10,5	247,2 ±12,5	272,2 ±5,4	264,9 ±10,0	268,4 ±8,4	273,1 ±8,1
1,8 g/kg	254,9 ±10,9	256,3 ±11,3	275,8 ±7,2	277,2 ±9,4	275,4 ±15,6	257,4 ±18,3	261,0 ±22,2	262,9 ±25,1	268,1 ±28,5	303,6 ±8,8	306,1 ±7,6	309,3 ±9,2	311,1 ±8,1
2,7 g/kg	265,4 ±19,3	253,1 ±13,4	279,4 ±11,7	260,6 ±16,9	253,5 ±18,1	256,8 ±20,3	259,0 ±23,0	260,2 ±24,9	289,1 ±21,0	293,3 ±20,9	315 ±20,9	289,3 ±11,7	311,1 ±20,1
4,0 g/kg	268,6 ±13,9	253,8 ±12,3	272,8 ±12,3	276,7 ±11,2	285,9 ±8,6	293,5 ±8,4	285,1 ±13,7	260,5 ±13,8	272,5 ±17,7	289,0 ±16,7	293,0 ±18,9	300,0 ±7,0	304,1 ±22,1
5,0 g/kg	321,6 ±6,9	330,0 ±15,1	321,2 ±16,8	304,7 ±11,9	284,2 ±12,3	272,3 ±17,3	274,8 ±20,9	269,6 ±24,5	301,1 ±24,7	294,8 ±39,6	298,4 ±31,4	302,3 ±28,2	307,1 ±23,1
<i>Fêmeas (g)</i>													
Controle	176,1 ±4,0	176,1 ±4,4	168,7 ±3,0	171,7 ±3,4	177,4 ±2,5	178,2 ±2,9	183,0 ±3,2	191,4 ±3,4	193,6 ±3,8	195,8 ±3,8	199,3 ±4,5	203,8 ±4,5	206,1 ±4,4
1,2 g/kg	196,2 ±9,7	199,7 ±9,2	197,2 ±9,3	201,1 ±11,0	196,5 ±12,1	188,3 ±5,7	198,2 ±14,2	198,4 ±15,9	201,5 ±16,3	206,6 ±16,6	208,9 ±15,7	211,9 ±16,7	216,1 ±10,1
1,8 g/kg	205,0 ±7,5	204,5 ±9,1	203,5 ±11,6	225,7 ±15,9	217,0 ±13,7	229,8 ±13,5	235,9 ±13,0	235,6 ±12,6	240,0 ±10,7	241,1 ±8,5	244,0 ±9,8	244,4 ±9,9	246,1 ±9,9
2,7 g/kg	211,6 ±18,1	217,8 ±20,4	211,7 ±20,6	208,8 ±18,6	218,7 ±13,0	207,1 ±20,1	209,1 ±22,4	225,9 ±26,8	214,7 ±24,9	216,2 ±25,7	218,5 ±27,5	224,0 ±29,5	223,1 ±30,1
4,0 g/kg	210,0 ±10,1	196,4 ±8,7	188,3 ±8,8	178,5 ±8,6	173,1 ±10,0	173,1 ±12,4	175,8 ±14,3	179,6 ±15,4	179,2 ±16,3	180,9 ±15,9	186,4 ±17,2	189,2 ±17,8	195,1 ±17,1
5,0 g/kg	171,9 ±3,8	161,0 ±3,6	153,1 ±3,8	151,6 ±2,5	155,6 ±1,9	155,4* ±7,6	154,2* ±9,0	155,8* ±9,9	159,2* ±11,4	163,8* ±12,6	170,1* ±13,1	175,9 ±11,0	180,1 ±8,1

Os valores expressam a média (± epm) do peso (g) de cada grupo experimental (n=6). *p<0,05 em relação ao grupo controle c

Gráfico 1. Evolução ponderal (média $\pm$ e.p.m.) de ratos após tratamento com EE de *Jatropha gossypifolia* L. (5 g/kg v.o.).



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=6.

água (mL) de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.

Dias após tratamento										Média±epm
5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Machos										
19,0	31,0	31,0	40,0	33,0	32,0	35,0	30,5	19,5	42,0	31,4±1,7
28,3	30,0	35,0	36,6	38,0	41,6	41,6	44,1	44,1	41,6	34,4±2,0
25,0	27,5	25,0	26,2	27,5	23,0	27,5	31,6	31,6	36,6	26,1±1,3
30,0	30,0	29,1	28,3	36,0	39,0	32,5	32,0	39,0	40,0	31,2±1,6
20,0	25,0	27,5	32,5	25,0	25,0	25,0	22,5	27,5	35,0	27,0±1,0
20,0	8,7	10,0	18,3	18,3	20,0	32,5	35,0	32,5	42,5	24,8±2,8
Fêmeas										
16,0	32,0	24,0	31,5	28,5	31,0	32,0	28,0	18,5	40,5	27,3±1,5
28,3	31,6	37,5	31,6	26,6	30,8	30,0	37,5	37,5	40,0	29,9±1,2
20,0	31,6	26,6	33,3	33,3	31,6	28,3	30,0	28,3	30,0	26,2±1,5
29,0	26,0	26,0	27,0	31,0	34,0	33,0	37,0	39,0	38,7	27,9±2,1
30,0	30,0	32,0	28,6	28,0	30,0	30,0	36,0	39,0	40,0	28,7±1,8
30,0	27,5	27,0	25,8	30,8	28,0	30,8	47,5	40,0	44,1	31,9±1,8

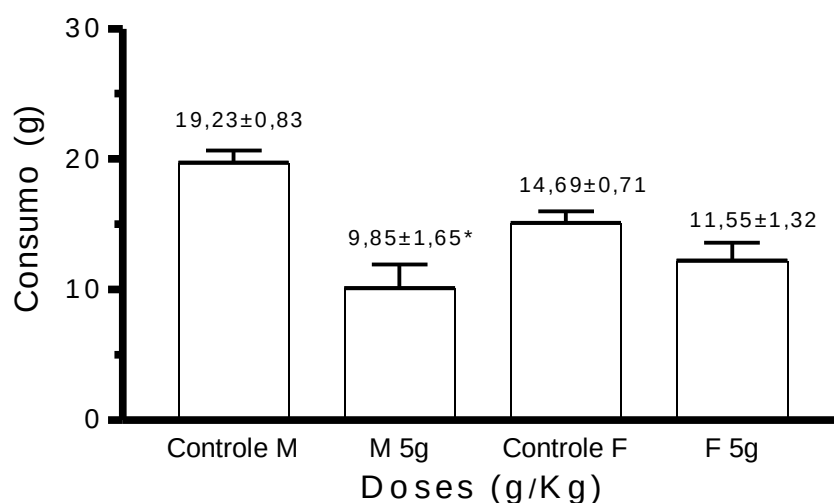
de água de cada grupo experimental (n=6). Na última coluna, registra-se a média do período (±epm) (n=14)

alimentos (g) por ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.

Dias após tratamento											Média±epm
4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Machos											
14,9	12,0	15,9	18,0	20,4	19,8	21,5	22,1	20,6	22,0	26,4	19,2±0,8
19,0	16,8	20,3	21,9	22,0	18,5	24,6	19,7	19,6	27,8	26,3	21,4±0,8
18,0	18,1	18,5	19,2	20,4	20,4	14,5	23,7	25,9	24,7	22,3	19,9±0,9
15,3	18,1	18,5	18,3	21,2	26,4	22,9	26,5	26,8	29,1	26,7	21,6±1,2
13,1	15,6	13,7	14,3	16,2	19,0	22,4	14,8	19,6	21,0	19,7	17,2±0,7
13,8	5,9	4,5	4,0	4,9	5,8	7,0	18,8	20,0	21,1	21,3	9,8±1,6*
Fêmeas											
10,6	9,9	13,1	14,3	16,3	14,9	17,1	17,3	16,0	18,0	21,9	14,6±0,7
13,2	13,8	14,1	19,1	13,2	11,8	14,2	15,8	18,2	18,2	17,1	15,6±0,6
15,1	14,0	10,1	12,4	15,0	14,1	14,2	14,6	16,4	14,5	14,3	14,4±0,4
15,1	12,4	10,9	11,2	11,4	13,5	13,8	15,9	18,0	16,5	17,7	14,3±0,6
13,2	16,6	18,9	10,9	14,2	11,5	11,9	14,4	17,2	18,6	18,0	15,6±0,7
14,7	8,9	12,0	11,9	11,2	13,1	14,0	16,7	18,9	20,2	19,4	11,5±1,3

no de alimentos de cada grupo (n=6). Na última coluna, registra-se a média do período (±epm) (n=14) *p<0,05

Gráfico 2. Consumo de alimentos (média $\pm$ e.p.m.) entre ratos após tratamento com EE de *Jatropha gossypifolia* L. (5 g/kg, v.o.).



Legenda: M (machos); F (fêmeas). *Valor estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=14.

5.2.3 Análise laboratorial de sangue

Alterações bioquímicas e hematológicas estatisticamente significativas foram observadas apenas entre os machos tratados com a maior dose (5 g/kg). Os danos em parâmetros bioquímicos (tabela 4) foram: aumento dos níveis sanguíneos de creatinina, AST, Sódio (Na⁺) e Potássio (K⁺) e diminuição dos níveis de uréia, albumina e amilase. Em termos de alterações hematológicas (tabela 5) evidenciou-se apenas uma leucopenia inespecífica.

ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.

Grupos											
controle	1,2 g/kg		1,8 g/kg		2,7 g/kg		4,0 g/kg		5,0 g/kg		
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
	3,2 ±0,11	3,2 ±0,09	3,1 ±0,15	3,3 ±0,05	3,4 ±0,14	3,3 ±0,09	3,4 ±0,05	3,1 ±0,1	3,0 ±0,1	2,7 ±0,02*	3,3 ±0,09
	6,8 ±0,2	6,3 ±0,2	6,6 ±0,19	5,8 ±0,28	6,4 ±0,19	6,1 ±0,18	6,6 ±0,26	5,7 ±0,3	6,7 ±0,14	6,4 ±0,09	6,9 ±0,16
	105,3 ±4,7	95,6 ±8,5	113,0 ±5,7	96,6 ±7,9	112,3 ±6,6	95,3 ±6,7	111,6 ±6,1	100,3 ±8,0	112,3 ±5,6	100,6 ±8,5	116,6 ±6,8
	0,8 ±0,14	0,8 ±0,07	0,9 ±0,07	1,2 ±0,21	0,8 ±0,11	1,2 ±0,14	0,9 ±0,14	1,0 ±0,15	0,8 ±0,09	1,0 ±0,19	0,9 ±0,09
	53,3 ±2,6	56,6 ±2,3	56,6 ±1,5	56,0 ±1,2	55,3 ±0,2	52,6 ±1,5	54,3 ±1,4	50,3 ±0,7	51,3 ±0,9	33,0 ±0,8*	45,6 ±1,4
	0,3 ±0,04	0,53 ±0,02	0,36 ±0,02	0,5 ±0,0	0,36 ±0,02	0,46 ±0,05	0,33 ±0,02	0,46 ±0,02	0,26 ±0,05	0,66 ±0,02*	0,23 ±0,02
	45,6 ±4,5	48,6 ±3,1	42,0 ±2,8	52,3 ±1,9	40,3 ±3,9	52,6 ±4,1	41,6 ±3,3	51,6 ±3,0	43,0 ±2,4	53,6 ±3,3	40,0 ±3,5
	63,0 ±3,3	89,0 ±5,2	67,0 ±2,8	86,6 ±9,1	60,0 ±4,0	92,0 ±3,7	59,0 ±2,1	81,3 ±3,5	60,3 ±4,0	86,0 ±2,6	59,6 ±4,6
	139,0 ±1,4	136,6 ±0,7	138,3 ±0,7	138,6 ±1,1	137,0 ±0,9	136,0 ±0,8	139,3 ±1,08	137,6 ±1,5	138,3 ±1,78	142,3 ±0,27*	139,3 ±0,98
	4,8 ±0,14	4,9 ±0,02	4,7 ±0,14	5,2 ±0,02	4,8 ±0,09	5,0 ±0,02	4,9 ±0,04	4,9 ±0,16	5,0 ±0,18	7,1 ±0,16*	4,6 ±0,15
	75,0 ±2,8	78,6 ±4,06	78,6 ±4,0	73,6 ±2,3	76,3 ±3,5	81,3 ±2,8	84,0 ±4,4	79,0 ±6,1	82,0 ±3,3	108,3 ±6,2*	84,0 ±3,5
	47,6 ±3,8	48,3 ±3,3	43,3 ±3,9	51,6 ±2,8	48,3 ±1,9	50,6 ±1,1	46,0 ±3,2	53,0 ±2,4	43,6 ±2,7	46,0 ±1,4	47,3 ±1,9
	96,6 ±6,0	114,0 ±4,9	96,3 ±3,9	116,3 ±5,5	95,6 ±3,3	120,3 ±2,8	90,3 ±4,2	114,3 ±3,5	96,0 ±5,3	129,3 ±10,9	95,6 ±2,8
	933,6 ±37,7	960,3 ±37,7	949,3 ±31,1	937,6 ±39,1	940,0 ±26,1	940,3 ±38,0	929,0 ±31,1	872,0 ±25,2	957,3 ±27,8	669,6* ±27,8	935,6 ±28,0

média ± e.p.m. (n=3). Referência: valores preconizados por Melo-Diniz (2000). Na⁺ (sódio); K⁺ (potássio); AST (aspartato aminotransferase); ALT (alanina aminotransferase). * estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, p<0,05)

de ratos tratados com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.

Grupos

Controle		1,2 g/kg		1,8 g/kg		2,7 g/kg		4,0 g/kg		5,0 g/kg	
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
8,0	7,8	8,5	8,0	7,7	7,6	8,1	8,2	8,0	8,2	8,0	7,9
±0,51	±0,44	±1,73	±0,41	±0,16	±0,15	±0,09	±0,2	±0,11	±0,08	±0,16	±0,31
14,5	13,1	14,3	13,0	13,6	13,5	13,7	13,3	14,2	13,6	13,8	12,8
±0,23	±0,35	0,3	±0,3	±0,26	±0,42	±0,16	±0,18	±0,23	±0,35	±0,73	±0,33
41,0	36,6	41,2	36,8	40,6	35,8	41,7	35,2	44,0	36,3	42,6	37,3
±0,94	±0,71	±0,78	±0,75	±1,43	±0,59	±0,91	±1,79	±1,2	±0,38	±1,11	±1,0
51,6	47,2	48,4	45,7	52,7	46,9	51,1	42,8	51,5	43,8	53,2	47,0
±2,2	±2,38	±1,15	±1,6	±2,52	±1,72	±1,62	±1,4	±1,13	±0,78	±1,1	±2,43
18,2	16,9	16,8	16,2	17,6	17,7	16,8	16,2	17,6	16,4	17,3	16,1
±0,89	±1,0	±0,04	±1,27	±0,71	±0,87	±0,36	±0,61	±0,52	±0,35	±0,97	±1,0
35,3	35,8	34,7	35,4	33,5	37,7	32,9	38,0	34,3	37,6	32,4	34,3
±0,23	±0,4	±0,78	±1,52	±0,95	±0,68	±0,75	±2,56	±1,13	±0,49	±0,24	±0,59
8,4	8,3	7,9	8,5	8,9	9,3	8,1	7,8	7,7	8,8	3,4	8,3
±0,75	±1,04	±0,76	±0,45	±0,54	±0,28	±0,57	±0,59	±0,58	±0,97	±0,47*	±1,14
20,0	25,3	27,6	27,3	25,6	27,6	21,0	27,0	27,6	26,0	24,3	30,3
±1,36	±2,59	±1,9	±0,71	±2,84	±1,78	±0,47	±5,5	±0,71	±6,59	±9,36	±3,66
1,8	1,6	1,6	0,6	0,6	1,3	1,6	1,3	1,0	1,3	1,0	1,3
±0,98	±0,27	±0,27	±0,27	±0,27	±0,27	±0,71	±0,54	±0,0	±0,27	±0,0	±0,27
77,0	70,6	70,2	69,5	72,5	69,5	75,4	69,0	69,8	71,0	72,0	66,3
±3,06	±2,68	±4,45	±1,18	±3,92	±5,21	±1,18	±5,88	±3,78	±6,59	±10,0	±3,53
2,0	2,3	1,6	2,6	1,3	1,6	2,0	2,3	1,6	1,6	2,6	2,0
±0,94	±0,27	±0,54	±0,27	±0,27	±0,27	±0,47	±0,27	±0,54	±0,27	±0,71	±0,81

presentam a média ± e.p.m. (n=3). Referência: valores preconizados por Melo-Diniz (2000). M: machos; F: fêmeas.
controle (ANOVA seguido de Tukey, p<0,05).

5.2.4 Estudo anatomopatológico e letalidade

O exame macroscópico das vísceras (fígado, pulmão, rins e coração) dos animais sobreviventes não detectou alterações relevantes. Somente em alguns dos animais tratados com a dose de 5 g/kg (v.o.) e que morreram ao longo do experimento (machos) foram constatadas alterações de coloração e consistência em coração, pulmão, fígado e intestino.

O exame histopatológico das vísceras evidenciou alterações apenas entre os animais tratados com a maior dose experimental. Ainda assim os efeitos foram pouco significativos, como a seguir se descreve.

O fígado de animais tratados com o EE de *Jatropha gossypifolia* L. na dose de 5 g/kg (v.o.) apresentou arquitetura lobular, com veias hepáticas terminais, de paredes finas, regularmente distribuídas (figura 6), chamando atenção à presença de moderada congestão venular, associada a fenômenos de dilatação e congestão sinusoidais (figura 7). No seio do lóbulo, embora os hepatócitos tenham se apresentado, na grande extensão do parênquima, como elementos isomorfos, foram identificados raros e isolados focos de hepatocitólise, para os quais houve afluxo inflamatório mononuclear (figura 8). Essa lesão era acompanhada de fibrose estromal mínima, perissinusoidal, em zona III, expressa pela coloração do vermelho picrossirius (figura 9). Os espaços portais e a interface portoparenquimatosa estavam destituídos de reação inflamatória. Em machos, observou-se congestão venosa portal (figura 10).

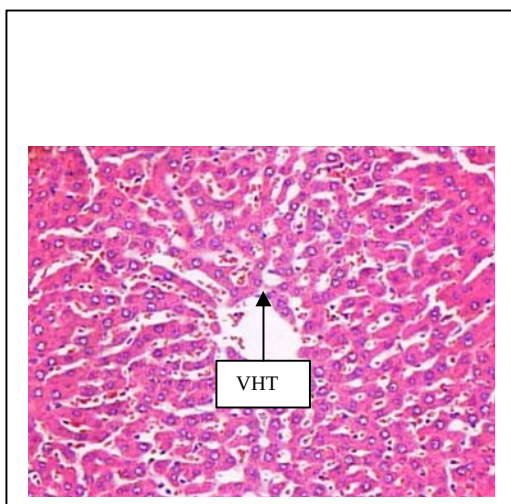


Figura 6. Tecido hepático com arquitetura lobular e veia hepática terminal (VHT) de paredes finas, em rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X250).

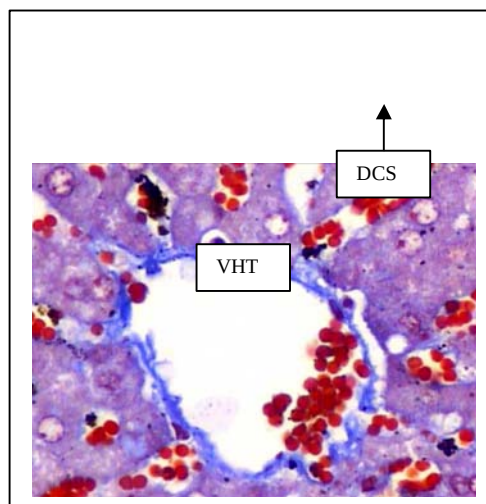


Figura 7. Congestão venular em veia hepática terminal (VHT) acompanhada de dilatação e congestão sinusoidais (DCS), em rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Tricrômico de Masson - X400).

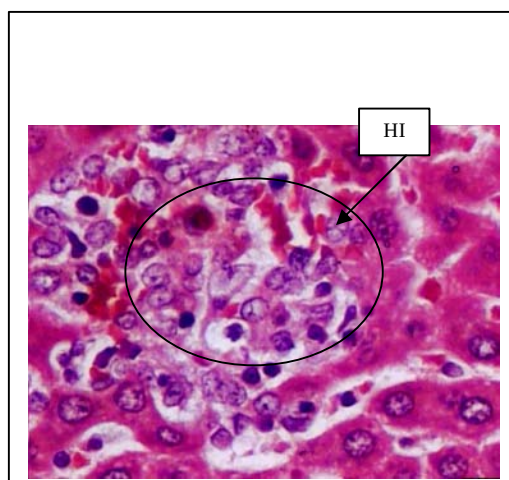


Figura 8. Hepatocitólise com afluxo inflamatório mononuclear (HI) em fígado de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X400).

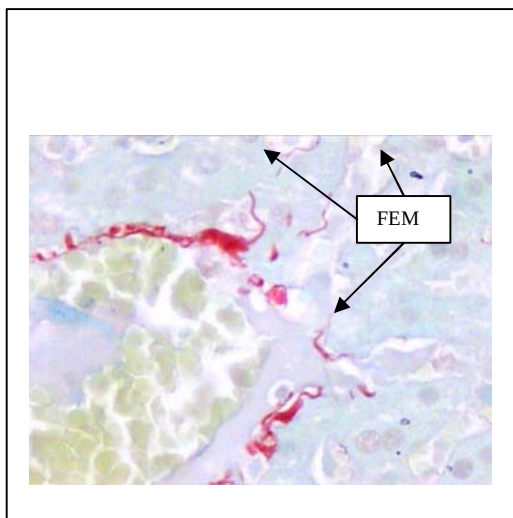


Figura 9. Fibrose estromal mínima (FEM) em zona 3 de lóbulo hepático de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Vermelho picrossirius - X400).

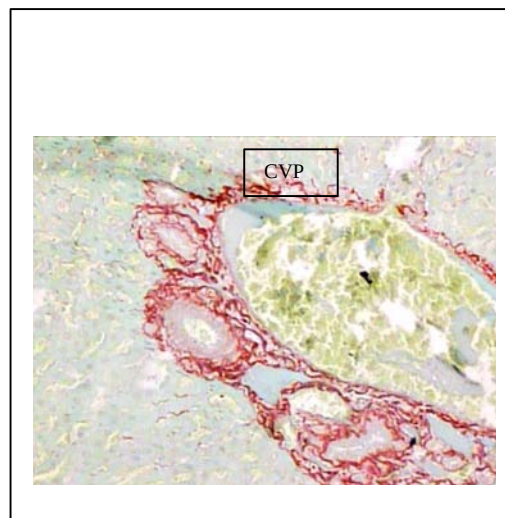


Figura 10. Congestão venosa portal (CVP) em rato macho tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Vermelho picrossirius - X100).

Nos pulmões, o EE de *Jatropha gossypifolia* L. na dose de 5 g/kg (v.o.) promoveu alargamento dos lóbulos em decorrência de processo inflamatório (figuras 11 e 12), observando, em adição, erosão de mucosa bronquiolar, associada à exsudação linfocitária e neutrocitária (figura 13). Em machos, essa exsudação também ocupou lumes das vias respiratórias bronquiolares. Septos conjuntivos interlobulares e interstício peribronquiolar foram sede de agregados linfóides, não encapsulados (figura 14). Os alvéolos apresentaram-se com paredes espessas em decorrência de exsudação linfocitária e neutrocitária (figura 15). Em fêmeas, o espaço aéreo luminal, mostrava-se ora ocupado por edema (transudato), ora por importante exsudação inflamatória mista (Figuras 16 e 17). A rede vascular apresentou-se fina e regularmente distribuída, encontrando-se congesta em machos.

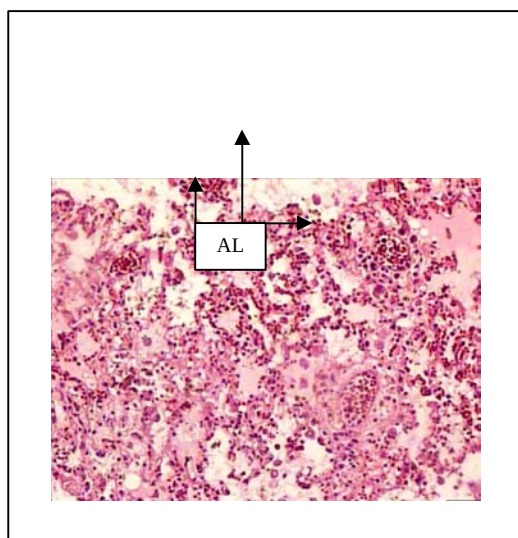


Figura 11. Alargamento dos lóbulos (AL) em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina X250).

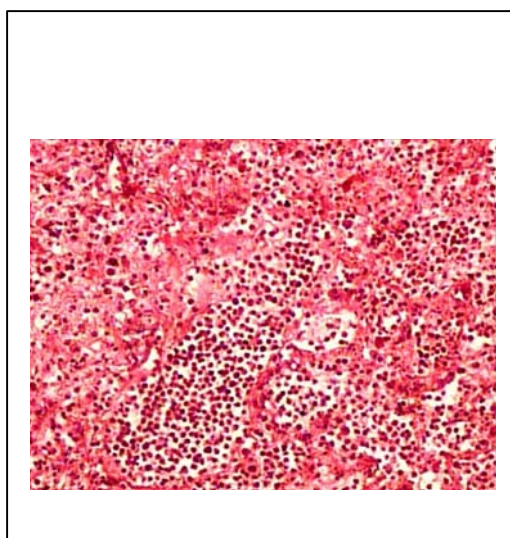


Figura 12. Infiltração inflamatória intersticial em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina X250).

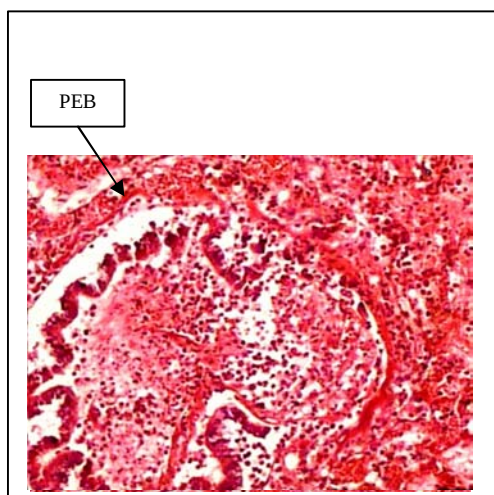


Figura 13. Processo erosivo bronquiolar (PEB) associado à exsudação leucocitária, em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X250).

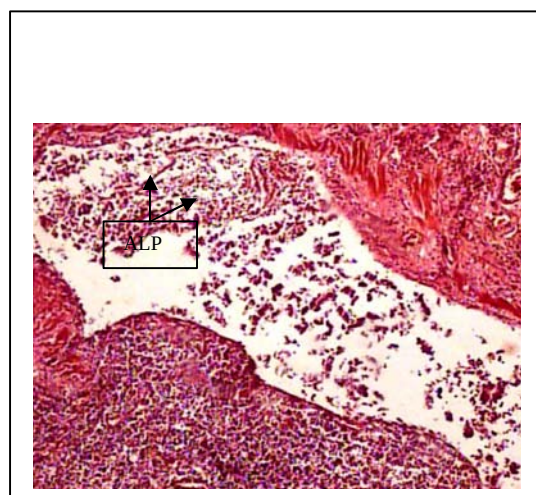


Figura 14. Agregados linfóides peribronquiolares (ALP) em tecido pulmonar de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X250).

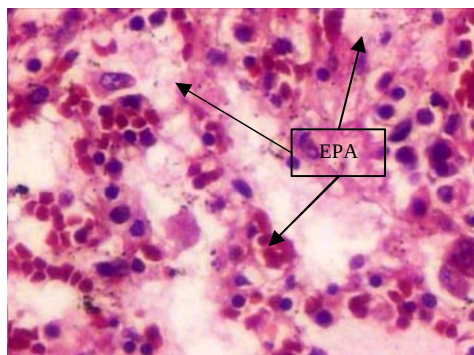


Figura 15. Espessamento de parede alveolar (EPA) por intensa exsudação leucocitária e histiocitária em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X100).

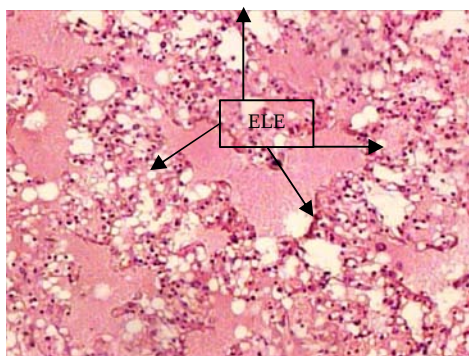


Figura 16. Espaço luminal ocupado por transudato (ELT) intra-alveolar em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X250).

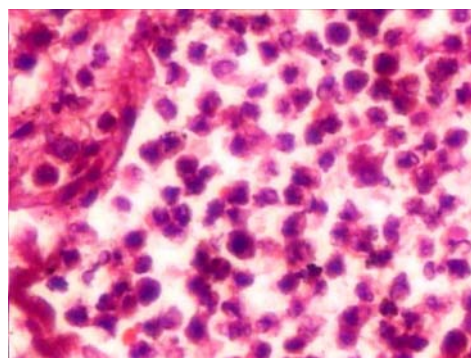


Figura 17. Comprometimento luminal decorrente de exsudação inflamatória em pulmão de rato tratado com dose única (5 g/kg v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina X400)

Nos rins, o EE de *Jatropha gossypifolia* L., mesmo na dose de 5 g/kg, não promoveu alterações histopatológicas significativas em ambos os sexos. Observou-se arquitetura lobular preservada com pirâmides medulares recobertas por tecido cortical. A córtex apresentou glomerulos regularmente distribuídos, cápsula de Bowman fina, com espaço de retração artefactual além de tufo capilares finos e mesângio delicado. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento de ducto coletor não evidenciaram particularidades histológicas, do mesmo modo que as alças de Henle e ductos coletores da pirâmide medular e o sistema pielocalicial e ainda, as colunas de Bertin da pélvis renal. Não foi observada reação inflamatória, tampouco fibrose no interstício (matriz), observando-se apenas congestão venosa. No tecido adiposo periférico foi constatada adiponecrose focal (exsudação histiocítica, com padrão xantomatoso).

No coração dos animais tratados com o EE de *Jatropha gossypifolia* L., também não foram evidenciadas alterações histopatológicas significativas em ambos os sexos. O epicárdio, revestido por células pavimentosas mesoteliais, exibiu tecido fibroconjuntivo, laxo, com vasos e filetes neurais, às vezes, em meio a tecido adiposo. O miocárdio representado por fibrocélulas (rabdomiócitos), anastomosantes, com estriações transversais e núcleos únicos ou duplos, centralmente posicionados. O endocárdio possuía endotélio apoiado em delgada membrana basal e revestia cavidades e válvulas cardíacas. As válvulas cardíacas apresentaram porção central formada por tecido fibroconjuntivo denso e revestimento endotelial.

Em termos de letalidade, foi constatado que o produto apenas produziu mortes em machos e nas duas maiores doses empregadas: 4,2 g/kg (16,6%) e 5 g/kg

(66,6%). As mortes ocorreram do terceiro ao décimo dia após o tratamento. A análise da letalidade em cada grupo experimental indicou que a dose letal mediana (DL_{50}) estava entre 4,2 e 5 g/kg para machos e superior a 5 g/kg em fêmeas. Ainda é possível afirmar que a dose máxima não letal (DMNL), no presente trabalho, foi de 2,7 g/kg para machos e de 5 g/kg para fêmeas (tabela 6).

Tabela 6. Letalidade (%) em ratos tratados (n=6) com diferentes doses únicas (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.

Grupos (doses)	Letalidade (%)	
	Machos	Fêmeas
Controle	0	0
1,2 g/kg (v.o.)	0	0
1,8 g/kg (v.o.)	0	0
2,7 g/kg (v.o.)	0	0
4,0 g/kg (v.o.)	16,6	0
5,0 g/kg (v.o.)	66,6	0

5. 3 Estudo toxicológico pré-clínico crônico

A seguir, são apresentados os resultados de parâmetros avaliados durante e após o tratamento prolongado (13 semanas) de ratos machos e fêmeas com o EE de *Jatropha gossypifolia* L., nas doses de 45 mg/kg, 135 mg/kg e 405 mg/kg, além de grupos controles e satélites.

5.3.1 Parâmetros avaliados durante o tratamento

A seguir, apresentamos os resultados dos parâmetros mensurados durante o tratamento crônico de ratos com o EE de *Jatropha gossypifolia* L.

5.3.1.1 Parâmetros avaliados diariamente

Todos os dias, durante o tratamento, foram feitas a triagem farmacológica e comportamental, ocorrência de mortes, evolução ponderal e consumo de água e alimentos.

a) Triagem farmacológica e comportamental e letalidade

Durante o tratamento, foram observados em alguns animais das três doses, de ambos os sexos e em intensidade proporcional à dose, os seguintes sinais gerais de toxicidade: piloereção; comportamento estereotipado de autolimpeza (*grooming*) e agrupamentos discretos. Nos animais tratados com 135 mg/kg e mais intensamente nos

tratados com 405 mg/kg, além dos efeitos já relatados, observou-se: prostração; contorções abdominais; aumento da evacuação; dispnéia; ptose palpebral e arraste do trem posterior, sinal esse que, associado à perda gradativa de peso e inanição, formou um conjunto de características anteriores ao óbito. A observação dos grupos satélites mostrou que esses efeitos foram reversíveis (Quadro 10).

Atividade farmacológica	Quantificação dos efeitos do EE (mg/Kg)					
	(0) sem efeito. (-) efeito diminuído. (+) efeito presente. (++) efeito intenso					
	GC	45	135	135 Sat	405	405 Sat
1-SNC						
a) Estimulante						
Piloereção	0	+	+	0	++	0
b) Depressora						
Ptose	0	0	+	0	++	0
Sedação	0	0	+	0	++	0
c) Outros comportamentos						
Agrupamentos	0	+	+	0	++	0
Dispnéia	0	0	+	0	++	0
Limpeza	0	+	+	0	++	0
Contorções abdominais	0	0	+	0	++	0
Arraste do trem posterior	0	0	+	0	++	0
2- SNA						
Defecação aumentada	0	0	+	0	++	0

Quadro 10. Triagem farmacológica e comportamental no estudo toxicológico pré-clínico crônico (tratamento v.o. com o EE de *Jatropha gossypifolia*).

Legenda: GC: Grupo Controle. Sat: grupo satélite.

Quanto à ocorrência de mortes, o percentual mais elevado se deu entre machos tratados com a dose de 405 mg/kg (46,6%). Em fêmeas tratadas com 405 mg/kg e entre machos e fêmeas que receberam 135 mg/kg, a letalidade foi de 13,3%. A dose de 45 mg/kg não produziu mortes no estudo crônico (tabela 7).

Tabela 7. Letalidade (%) em ratos (n=10) sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia*.

Grupos (doses)	Letalidade (%)	
	Machos	Fêmeas
Controle	0	0
45 mg/kg	0	0
135 mg/kg	13,3	13,3
405 mg/kg	46,6	13,3

b) Evolução ponderal, consumo de água e alimentos

Inicialmente, em relação à evolução ponderal de ratos tratados com diferentes doses do EE de *Jatropha gossypifolia* L., a tabela 8 e os gráficos 3 e 4 mostram resultados diversificados. De um modo geral, doses menores do extrato produzem aumento desse parâmetro, enquanto doses maiores o reduzem. A menor dose (45 mg/kg) promoveu ganho de peso tanto em machos (a partir do meio do tratamento) quanto em fêmeas (até o meio do experimento). Por outro lado a maior dose (405 mg/kg) causou

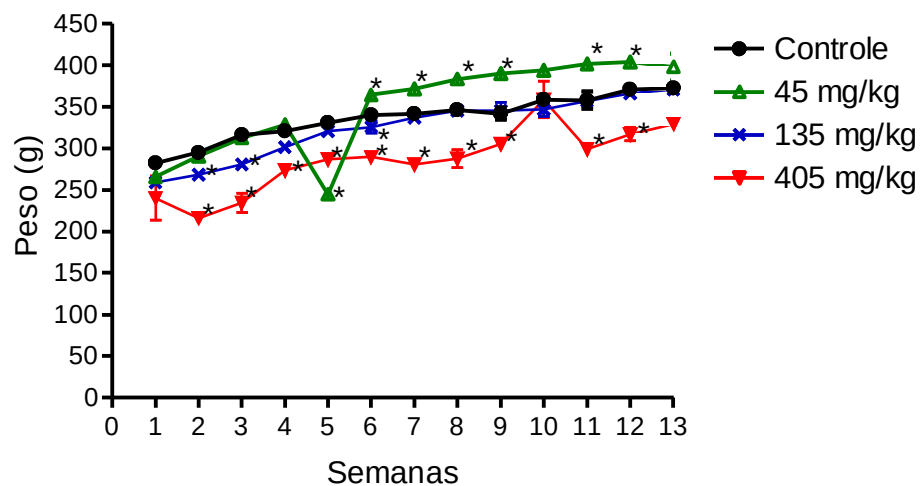
marcante redução de peso corpóreo em machos (quase todo o período) e em fêmeas (apenas na segunda semana). De modo intermediário, a dose de 135 mg/kg reduziu o ganho corpóreo em machos (início e meio do tratamento) e aumentou esse parâmetro em fêmeas durante quase todo o experimento.

Tabela 8. Evolução ponderal em ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *J*

Grupos	Semanas após o tratamento									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Machos (g)										
Controle	282,6 ±2,0	295,0 ±2,8	316,0 ±4,1	320,6 ±4,9	331,0 ±1,6	340,4 ±1,0	341,9 ±2,2	346,4 ±5,8	341,8 ±7,3	358,7 ±4,2
45 mg/kg	265,5 ±4,5	290,2 ±4,4	312,7 ±2,8	328,8 ±3,3	244,6* ±1,9	364,4* ±2,3	371,5* ±1,5	383,5* ±0,9	390,0* ±1,8	393,8 ±2,6
135 mg/kg	259,0 ±4,0	268,2* ±1,9	280,6* ±4,3	301,4 ±2,4	320,8 ±3,5	325,6* ±7,4	336,8 ±0,9	345,3 ±2,5	345,3 ±10,1	346,5 ±7,8
405 mg/kg	240,0 ±26,5	216,0* ±3,6	234,5* ±11,5	273,4* ±2,4	286,5* ±2,9	289,8* ±1,8	280,6* ±4,1	287,5* ±10,8	305,4* ±0,8	358,7 ±22,2
Fêmeas (g)										
Controle	178,6 ±0,8	195,0 ±1,6	206,7 ±1,1	212,2 ±1,7	221,4 ±2,0	228,3 ±0,7	230,1 ±0,6	238,2 ±1,4	240,8 ±0,2	241,8 ±0,3
45 mg/kg	228,0* ±3,6	227,7* ±2,5	230,9* ±4,1	232,8* ±2,8	239,4* ±0,4	246,6* ±1,0	246,9* ±2,2	247,0 ±1,6	246,7 ±2,3	257,3 ±0,4
135 mg/kg	215,4 ±1,5	218,2* ±0,9	234,2* ±2,3	222,7 ±8,3	246,3* ±0,8	252,3* ±1,3	261,4* ±1,3	269,2* ±2,5	266,0* ±0,5	268,4 ±0,1
405 mg/kg	213,3 ±10,1	171,9* ±2,0	196,1 ±6,0	206,7 ±1,9	222,6 ±2,2	227,7 ±1,7	220,9 ±1,0	228,7 ±0,7	232,0 ±0,1	250,8 ±15,6

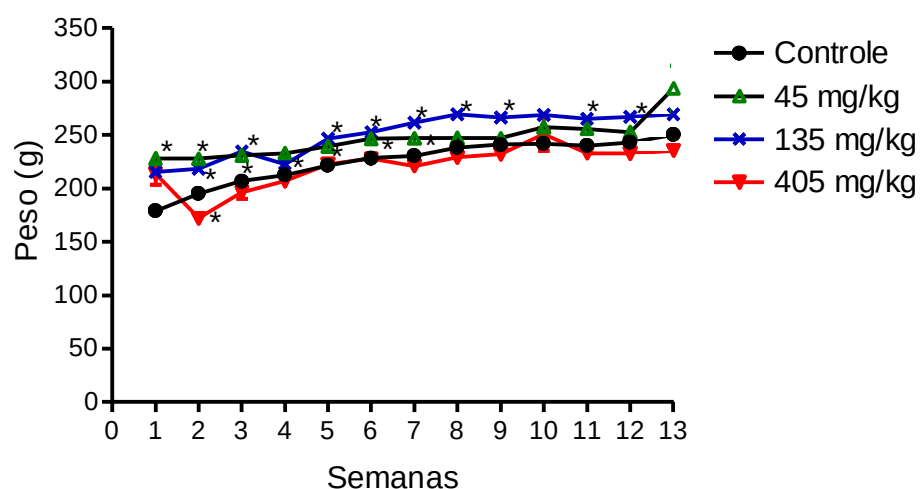
Os valores expressam a média semanal ($\pm$ e.p.m.) do peso (g) de cada grupo experimental (n=10). *p<0,05 (teste de Tukey) em relação ao grupo controle correspondente.

Gráfico 3. Evolução ponderal em machos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

Gráfico 4. Evolução ponderal em fêmeas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

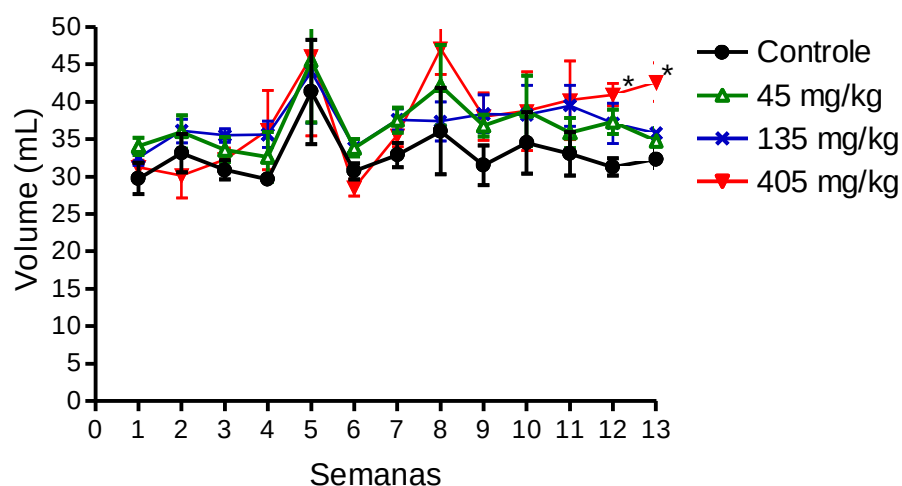
O consumo de água foi aumentado, de modo estatisticamente significativo, em poucos momentos durante o experimento e apenas em animais tratados com as maiores doses. A dose de 135 mg/kg aumentou esse parâmetro apenas em fêmeas e ao final do tratamento e a dose de 405 mg/kg o elevou tanto em machos (somente ao final do período), quanto em fêmeas (já no início do tratamento). Esses resultados podem ser vistos na tabela 9 e nos gráficos 5 e 6.

Tabela 9. Consumo semanal de água (mL) por ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses de *Gossypiiifolia* L.

Grupos	Semanas após o tratamento											
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
<i>Machos</i>												
Controle	29,7 ±2,1	33,1 ±2,5	30,9 ±1,3	29,6 ±0,7	41,3 ±6,9	30,7 ±1,0	32,9 ±1,6	36,1 ±5,7	31,5 ±2,6	34,5 ±4,1	33,0 ±2,9	31,7 ±1,8
45 mg/kg	34,0 ±1,1	36,0 ±2,2	33,6 ±1,6	32,6 ±3,3	45,5 ±8,2	33,8 ±1,1	37,5 ±1,7	42,2 ±5,4	36,8 ±1,4	38,8 ±4,7	35,8 ±2,0	37,5 ±1,9
135 mg/kg	32,5 ±0,9	36,1 ±1,5	35,5 ±0,9	35,6 ±1,7	44,0 ±6,8	33,9 ±0,2	37,6 ±1,4	37,4 ±2,6	38,4 ±2,5	38,3 ±3,9	39,5 ±2,7	37,8 ±2,2
405 mg/kg	31,2 ±0,9	30,1 ±2,9	32,3 ±1,5	36,2 ±5,3	46,1 ±10,6	28,5 ±1,1	35,5 ±1,5	47,1 ±3,4	38,0 ±3,1	38,7 ±5,2	40,2 ±5,2	40,9 ±1,8
<i>Fêmeas</i>												
Controle	24,7 ±1,6	30,0 ±2,2	27,0 ±1,5	27,3 ±1,9	37,1 ±6,1	28,0 ±1,5	30,0 ±1,8	31,6 ±3,7	28,7 ±2,1	27,2 ±3,6	27,5 ±2,2	27,8 ±1,9
45 mg/kg	28,0 ±0,8	28,6 ±1,8	27,9 ±1,5	27,8 ±2,0	32,1 ±5,9	34,0 ±7,2	28,3 ±0,5	31,9 ±3,6	28,3 ±1,9	31,9 ±2,8	32,1 ±3,6	27,8 ±1,9
135 mg/kg	26,8 ±0,9	30,4 ±2,1	31,8 ±1,5	32,0 ±0,8	38,4 ±7,8	29,3 ±1,1	31,9 ±1,4	35,4 ±3,4	31,1 ±2,2	32,7 ±3,5	29,7 ±3,7	30,8 ±1,9
405 mg/kg	29,2 ±1,5	31,2 ±3,0	34,3* ±1,6	31,0 ±2,3	42,0 ±8,1	29,9 ±1,1	33,8 ±1,4	35,3 ±5,2	29,7 ±1,9	31,4 ±3,7	33,4 ±3,1	32,8 ±1,9

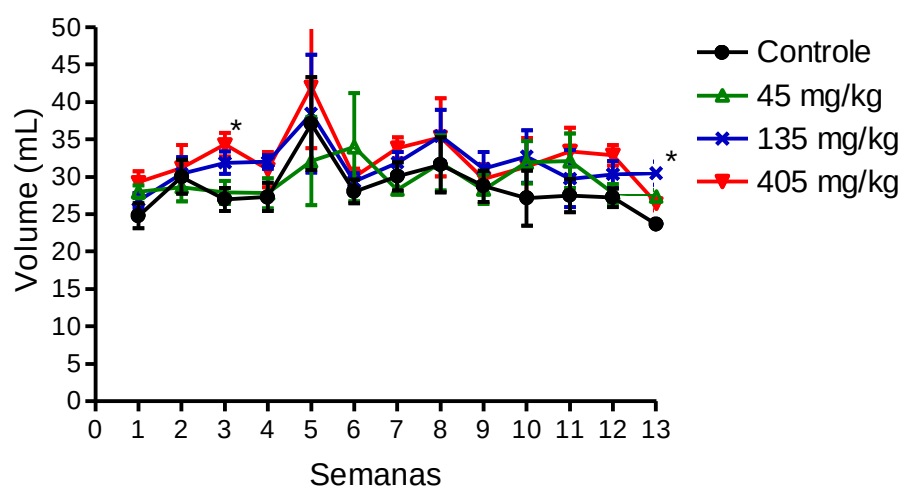
Os valores expressam a média semanal ($\pm$ e.p.m.) do consumo de água (mL) de cada grupo experimental (n=10). *p<0,05 (ANOVA) em relação ao grupo controle correspondente.

Gráfico 5. Consumo semanal de água por ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

Gráfico 6. Consumo semanal de água por ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

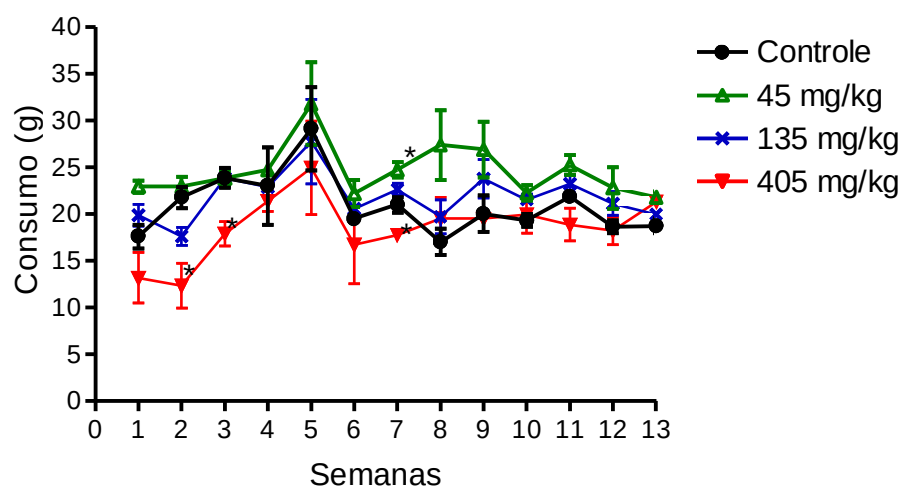
O efeito do extrato sobre o consumo de alimentos também foi significativo em poucos momentos durante o tratamento. As alterações nesse parâmetro correlacionam-se com as ocorridas na evolução ponderal percebendo-se uma elevação em doses menores e uma redução em doses mais elevadas. A menor dose (45 mg/kg) aumentou a ingestão alimentar apenas na sétima semana de tratamento e somente em machos. A maior dose (405 mg/kg) reduziu o consumo alimentar em machos e fêmeas apenas no início do experimento (tabela 10 e gráficos 7 e 8).

Tabela 10. Consumo semanal de alimentos (g) por ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses de *Gossypiiifolia* L.

Grupos	Semanas											
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a
<i>Machos</i>												
Controle	17,6 ±1,2	21,7 ±1,1	23,9 ±1,0	23,0 ±4,1	29,1 ±4,4	19,5 ±0,4	21,0 ±0,8	17,0 ±1,3	20,0 ±1,9	19,3 ±0,7	21,9 ±0,4	18,0 ±0,3
45 mg/kg	22,9 ±0,6	22,9 ±1,0	23,8 ±0,7	24,7 ±0,5	31,8 ±4,4	22,1 ±1,4	24,7* ±0,8	27,3 ±3,7	26,9 ±2,9	22,2 ±0,8	25,2 ±1,0	22,0 ±2,0
135 mg/kg	19,9 ±1,1	17,6 ±0,9	23,9 ±0,9	22,9 ±0,3	27,7 ±4,5	20,5 ±0,4	22,6 ±0,6	19,7 ±1,8	23,7 ±2,0	21,5 ±0,5	23,2 ±0,9	21,0 ±1,0
405 mg/kg	13,1 ±2,6	12,3* ±2,3	17,9* ±1,2	21,4 ±1,1	24,9 ±5,0	16,7 ±4,1	17,7* ±0,4	19,5 ±2,2	19,5 ±0,5	19,9 ±2,0	18,8 ±1,7	18,0 ±1,0
<i>Fêmeas</i>												
Controle	12,9 ±0,7	17,2 ±0,9	16,8 ±0,7	21,5 ±5,4	17,3 ±0,9	14,3 ±0,5	17,1 ±0,4	15,5 ±1,0	17,6 ±1,5	14,3 ±0,6	16,0 ±0,5	14,0 ±1,0
45 mg/kg	15,5 ±0,5	16,5 ±0,8	16,2 ±1,3	14,6 ±0,5	19,0 ±3,5	14,7 ±1,2	16,4 ±0,5	16,7 ±2,5	15,7 ±1,6	15,7 ±0,7	17,8 ±0,4	16,0 ±2,0
135 mg/kg	13,5 ±0,5	15,4 ±1,2	15,5 ±1,8	16,8 ±0,4	21,8 ±3,1	15,7 ±0,5	19,3 ±1,0	21,0 ±2,6	19,0 ±2,1	15,3 ±0,5	16,7 ±1,3	17,0 ±2,0
405 mg/kg	8,8 ±1,4	9,4* ±1,9	17,4 ±0,6	15,1 ±0,7	22,2 ±4,3	16,1 ±4,1	16,0 ±0,1	14,4 ±0,7	15,9 ±1,1	13,7 ±0,7	16,2 ±1,3	13,0 ±0,0

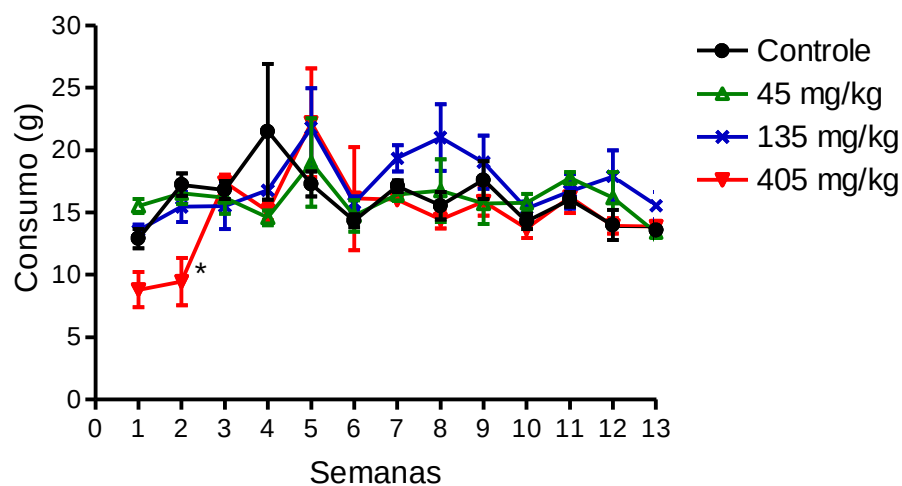
Os valores expressam a média semanal ($\pm$ e.p.m.) do consumo de alimentos (g) de cada grupo experimental (n=10). *p<0,05 (teste t) em relação ao grupo controle correspondente.

Gráfico 7. Consumo semanal de alimentos por ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

Gráfico 8. Consumo semanal de alimentos por ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

5.3.1.2 Parâmetros avaliados quinzenalmente

Durante o tratamento pré-clínico crônico, quinzenalmente, foram feitas avaliações nos seguintes parâmetros: temperatura colônica, glicemia caudal, comportamento (teste de campo aberto) e capacidade motora (teste de rota rod).

a) Temperatura colônica

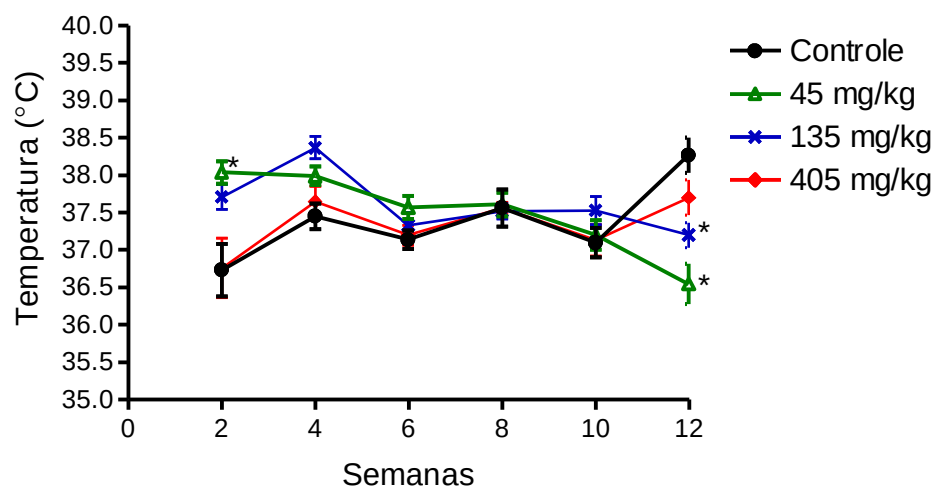
Quanto à temperatura corporal, as alterações observadas foram poucas e esporádicas. O extrato promoveu aumento desse parâmetro apenas no início de tratamentos de machos com 45 mg/kg. Ao final do tratamento, a temperatura corpórea caiu significativamente tanto em machos tratados com 45 mg/kg e 135 mg/kg quanto em fêmeas da dose de 405 mg/kg (tabela 11 e gráficos 9 e 10).

Tabela 11. Temperatura quinzenal (°C) de ratos (machos e fêmeas) sob tratamento prolongado com diferentes doses de *Jatropha gossypifolia* L.

Grupos	Semanas				
	2 ^a	4 ^a	6 ^a	8 ^a	10 ^a
<i>Machos</i>					
Controle	36,7 ±0,3	37,4 ±0,1	37,1 ±0,1	37,5 ±0,2	37,1 ±0,1
45 mg/kg	38* ±0,1	37,9 ±0,1	37,5 ±0,1	37,6 ±0,1	37,2 ±0,1
135 mg/kg	37,7 ±0,1	38,3 ±0,1	37,3 ±0,1	37,5 ±0,1	37,5 ±0,1
405 mg/kg	36,7 ±0,4	37,6 ±0,2	37,2 ±0,1	37,5 ±0,0	37,1 ±0,2
<i>Fêmeas</i>					
Controle	37,6 ±0,1	37,9 ±0,1	38,2 ±0,2	38,4 ±0,1	38,4 ±0,1
45 mg/kg	38,2 ±0,0	38,5 ±0,2	37,8 ±0,1	38 ±0,3	37,8 ±0,0
135 mg/kg	38,2 ±0,1	38,2 ±0,1	37,7 ±0,2	38,3 ±0,2	38,3 ±0,2
405 mg/kg	37,5 ±0,1	37,3 ±0,4	37,4 ±0,1	37,6 ±0,1	37,7 ±0,1

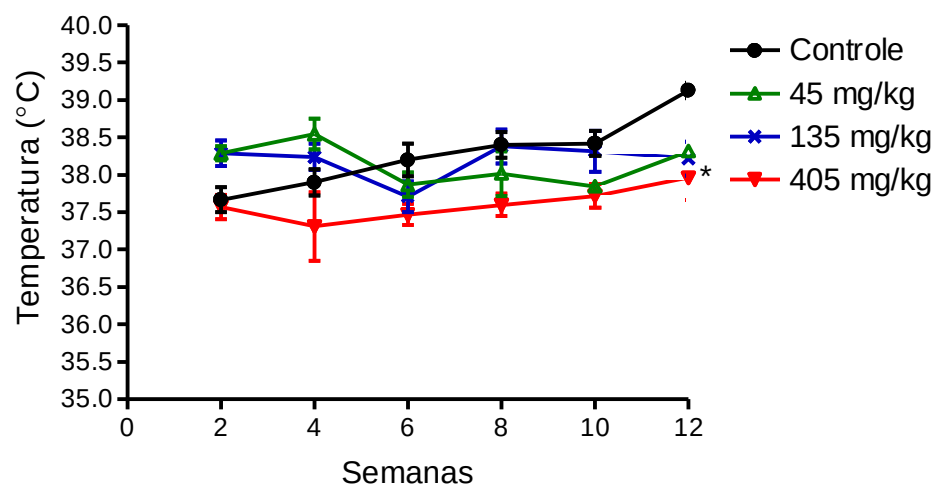
Os valores expressam a média (± e.p.m.) da temperatura quinzenal (°C) de cada grupo experimental (n=10). *p<0,05 (ANOVA) em relação ao grupo controle correspondente.

Gráfico 9. Temperatura quinzenal (°C) de ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

Gráfico 10. Temperatura quinzenal (°C) de ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=10.

b) Glicemia caudal

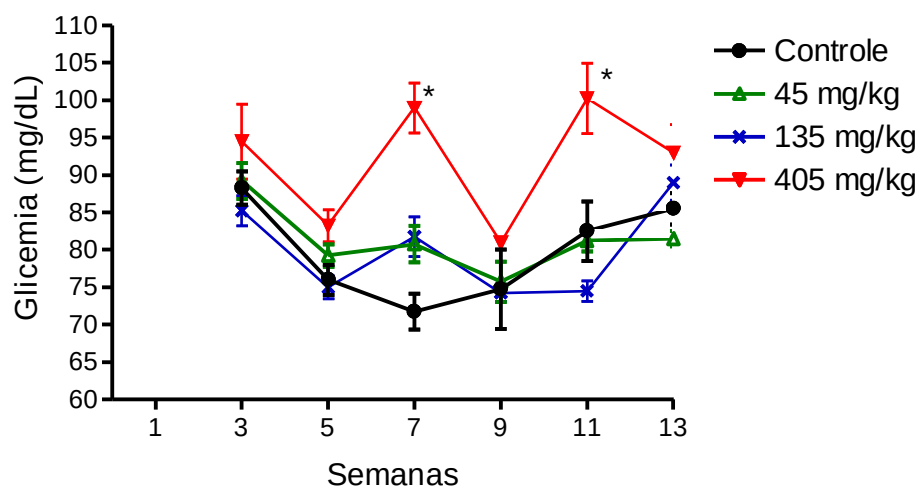
O tratamento prolongado com o extrato produziu um efeito hiperglicemiante em alguns momentos durante o tratamento. Em machos, esse efeito só se observou entre aqueles tratados com 405 mg/kg no meio e ao final do experimento. Em fêmeas a dose de 45 mg/kg aumentou a glicemia apenas durante a sétima semana do tratamento (tabela 12 e gráficos 11 e 12).

Tabela 12. Glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de ratos sob tratamento prolongado com diferentes doses de *gossypiiifolia* L.

Grupos	Semanas					
	3 ^a	5 ^a	7 ^a	9 ^a	11 ^a	13 ^a
<i>Machos</i>						
Controle	88,2 ±2,2	76,0 ±1,9	71,7 ±2,3	74,7 ±5,2	82,5 ±4,0	85,2 ±2,1
45 mg/kg	89,2 ±2,4	79,2 ±1,5	80,7 ±2,4	75,7 ±2,1	81,2 ±1,4	81,2 ±1,4
135 mg/kg	85,2 ±2,0	75,0 ±1,5	81,7 ±2,6	74,2 ±1,1	74,5 ±1,3	89,2 ±2,1
405 mg/kg	94,5 ±5,0	83,2 ±2,1	99,0* ±3,3	81,0 ±0,7	100,3* ±4,7	93,2 ±3,1
<i>Fêmeas</i>						
Controle	86,0 ±3,6	68,5 ±2,9	74,0 ±4,9	66,7 ±2,0	83,2 ±1,1	82,2 ±4,1
45 mg/kg	86,5 ±6,2	74,0 ±2,6	90,0* ±2,6	80,7 ±5,8	76,0 ±2,6	87,2 ±2,1
135 mg/kg	86,2 ±2,4	73,2 ±2,3	87,0 ±3,8	77,2 ±1,9	74,7 ±2,6	90,2 ±2,1
405 mg/kg	87,0 ±4,1	74,2 ±1,5	81,0 ±3,4	63,5 ±0,8	89,5 ±2,6	85,2 ±2,1

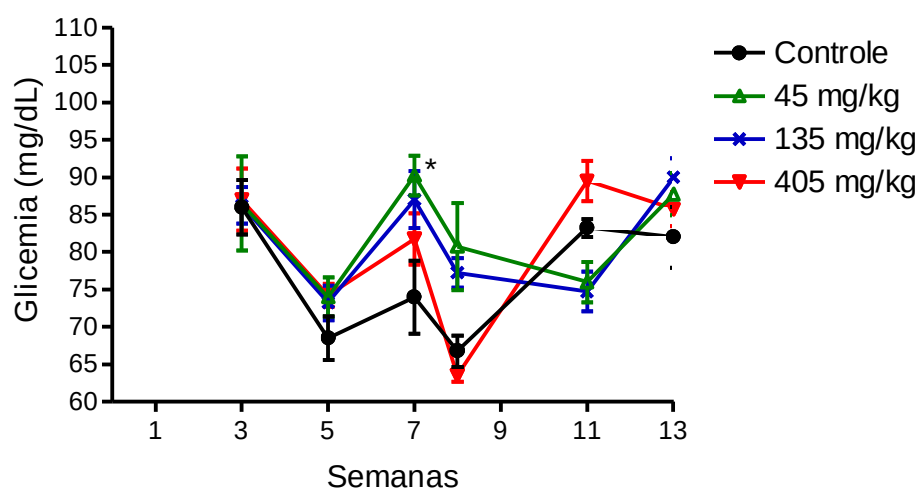
Os valores expressam a média (±e.p.m.) da glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de cada grupo experimental (n=4). *p<0,05 (A relação ao grupo controle correspondente).

Gráfico 11. Glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de ratos sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=4.

Gráfico 12. Glicemia caudal quinzenal (mg/dL) de ratas sob tratamento prolongado (13 semanas) com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



*Valores estatisticamente diferentes do grupo controle (ANOVA seguido de Tukey, $p < 0,05$). N=4.

c) Teste do campo aberto (*Open Field*)

Neste experimento, em todos os parâmetros observados, a única alteração estatisticamente significativa foi uma redução no comportamento “levantar” (*rearing*) no início do tratamento de fêmeas da maior dose (405 mg/kg) conforme apresentado na tabela 14 e no gráfico 13. Não foram observadas alterações nos demais parâmetros avaliados, a saber: ambulação (tabela 13), limpeza ou *grooming* (tabela 15) e defecação (tabela 16).

Tabela 13. Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre a ambulação de ratos no experimento de Campo Aberto

Grupos	Semanas					
	2	4	6	8	10	12
<i>Machos</i>						
Controle	30,2 ±4,2	8,6 ±2,2	10,7 ±1,3	14,8 ±1,6	12,2 ±2,3	13,7 ±2,6
45 mg/kg	30,0 ±2,0	12,0 ±1,7	16,0 ±2,9	21,4 ±1,9	29,0 ±5,7	17,6 ±5,5
135 mg/kg	32,6 ±2,9	17,4 ±3,1	15,4 ±1,5	15,4 ±1,8	13,4 ±1,2	20,2 ±4,5
405 mKg	17,8 ±5,5	14,2 ±6,9	15,4 ±1,6	5,0 ±2,1	16,5 ±0,6	15,5 ±1,5
<i>Fêmeas</i>						
Controle	49,0 ±0,4	22,0 ±3,9	20,0 ±2,7	24,4 ±3,5	18,8 ±3,7	20,0 ±8,9
45 mg/kg	35,4 ±3,3	13,8 ±4,5	14,4 ±2,9	20,4 ±3,0	19,2 ±5,8	13,0 ±6,5
135 mg/kg	38,8 ±4,0	24,0 ±3,8	13,4 ±2,5	30,6 ±2,4	31,6 ±4,0	22,2 ±3,4
405 mKg	32,2 ±7,7	21,4 ±9,4	12,4 ±1,9	27,0 ±5,9	18,0 ±5,2	30,7 ±2,2

Os valores expressam a média (± e.p.m.) do número de ambulações de cada grupo experimental (n=5).

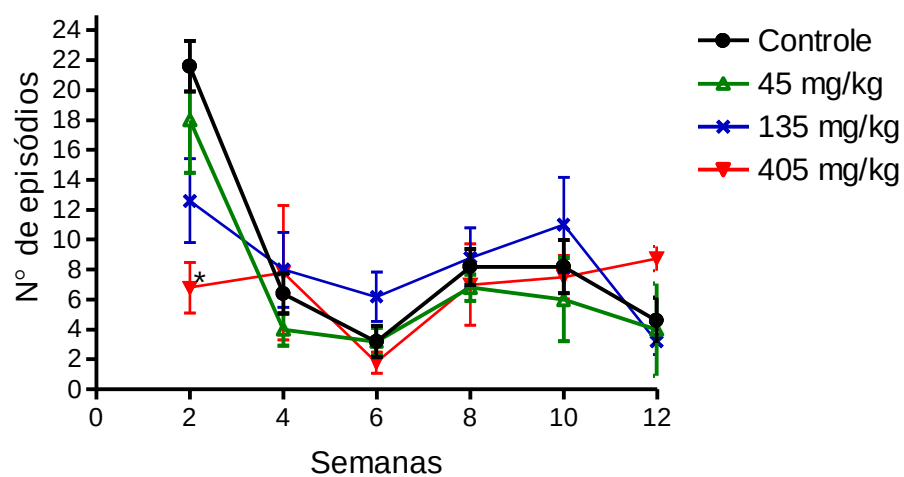
*p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey) em relação ao grupo controle correspondente.

Tabela 14. Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre o número de execuções do comportamento “levantar” (rearing) de ratos no experimento de Campo Aberto.

Grupos	Semanas					
	2	4	6	8	10	12
<i>Machos</i>						
Controle	8,6 ±1,7	3,0 ±1,0	2,7 ±0,7	1,8 ±0,3	5,4 ±2,5	4,7 ±0,7
45 mg/kg	8,0 ±2,1	2,4 ±1,2	5,6 ±3,3	4,4 ±1,4	3,6 ±1,1	6,0 ±2,0
135 mg/kg	6,0 ±1,6	10,4 ±1,8	2,0 ±0,7	3,4 ±0,8	2,8 ±1,4	5,6 ±1,4
405mKg	3,7 ±1,4	7,0 ±4,9	3,2 ±1,2	3,0 ±0,9	4,0 ±0,0	2,5 ±0,6
<i>Fêmeas</i>						
Controle	21,6 ±1,7	6,4 ±1,3	3,2 ±1,0	8,2 ±1,1	8,2 ±1,7	4,6 ±1,5
45 mg/kg	18,0 ±3,5	4,0 ±1,0	3,2 ±0,9	6,8 ±0,8	6,0 ±2,7	4,0 ±3,1
135 mg/kg	12,6 ±2,7	8,0 ±2,5	6,2 ±1,6	8,8 ±1,9	11,0 ±3,1	3,2 ±0,8
405 mKg	6,8* ±1,6	7,8 ±4,4	1,8 ±0,7	7,0 ±2,7	7,5 ±1,4	8,7 ±0,7

Os valores expressam a média ($\pm$ e.p.m.) do número de execuções do comportamento “levantar” de cada grupo experimental (n=5). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey) em relação ao grupo controle correspondente.

Gráfico 13. Representação gráfica do efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre o número de execuções do comportamento “levantar” (*rearing*) de ratas no experimento de Campo Aberto



Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de cada grupo (n=5). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey).

Tabela 15. Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre o número de execuções do comportamento “limpeza” (grooming) de ratos no experimento de Campo Aberto

Grupos	Semanas					
	2	4	6	8	10	12
<i>Machos</i>						
Controle	11,7 ±4,3	5,7 ±3,1	3,2 ±2,5	9,8 ±3,8	3,0 ±2,0	8,2 ±3,8
45 mg/kg	18,6 ±3,0	14,4 ±4,7	13,2 ±3,7	14,6 ±2,0	14,8 ±4,4	10,8 ±4,1
135 mg/kg	9,8 ±3,5	12,0 ±1,3	11,3 ±5,9	6,8 ±2,5	10,2 ±3,1	8,5 ±2,5
405 mKg	8,0 ±4,3	6,5 ±0,6	3,7 ±1,7	10,0 ±3,2	13,0 ±0,4	3,0 ±1,3
<i>Fêmeas</i>						
Controle	6,7 ±3,4	4,8 ±3,2	8,8 ±4,1	11,0 ±4,4	6,8 ±2,0	1,8 ±0,6
45 mg/kg	4,9 ±2,1	1,2 ±0,5	7,8 ±3,9	8,9 ±3,5	8,6 ±3,6	0,5 ±0,3
135 mg/kg	10,6 ±6,2	10,6 ±2,4	2,4 ±0,8	15,8 ±5,4	6,0 ±2,2	8,2 ±2,1
405 mKg	10,4 ±4,2	9,5 ±6,1	6,7 ±2,8	9,0 ±3,7	19,5 ±7,0	6,7 ±1,7

Os valores expressam a média ($\pm$ e.p.m.) do número de execuções do comportamento “limpeza” de cada grupo experimental (n=5). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey) em relação ao grupo controle correspondente.

Tabela 16. Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre a defecação (avaliada em número de bolos fecais) de ratos no experimento de Campo Aberto.

Grupos	Semanas					
	2	4	6	8	10	12
<i>Machos</i>						
Controle	5,2 ±0,7	3,0 ±0,5	1,5 ±0,7	3,8 ±1,6	4,0 ±1,2	3,5 ±1,1
45 mg/kg	1,8 ±0,4	4,2 ±1,2	2,5 ±0,6	2,8 ±0,7	1,0 ±0,3	2,0 ±0,6
135 mg/kg	3,0 ±1,0	1,2 ±0,6	2,0 ±0,6	3,2 ±1,0	3,6 ±0,6	1,6 ±0,7
405 mKg	4,5 ±1,6	3,3 ±0,9	3,4 ±1,0	2,5 ±0,5	3,5 ±0,6	4,5 ±0,2
<i>Fêmeas</i>						
Controle	4,5 ±0,4	1,8 ±0,7	3,4 ±0,9	2,6 ±1,9	2,8 ±1,1	0,8 ±0,5
45 mg/kg	6,0 ±0,3	5,0 ±1,3	3,4 ±0,4	4,8 ±1,0	4,6 ±1,1	1,0 ±0,4
135 mg/kg	4,6 ±1,0	4,0 ±1,0	5,4 ±0,9	6,0 ±1,4	3,2 ±1,2	1,4 ±0,8
405 mKg	2,8 ±0,9	2,0 ±0,8	2,2 ±0,7	1,8 ±0,6	1,5 ±0,3	1,5 ±0,9

Os valores expressam a média ($\pm$ e.p.m.) do número de bolos fecais de cada grupo experimental (n=5). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey) em relação ao grupo controle correspondente.

d) Teste *Rota Rod*

Na avaliação da atividade motora dos animais, através do teste *Rota Rod*, a única alteração estatisticamente significativa foi a redução do tempo de permanência, na

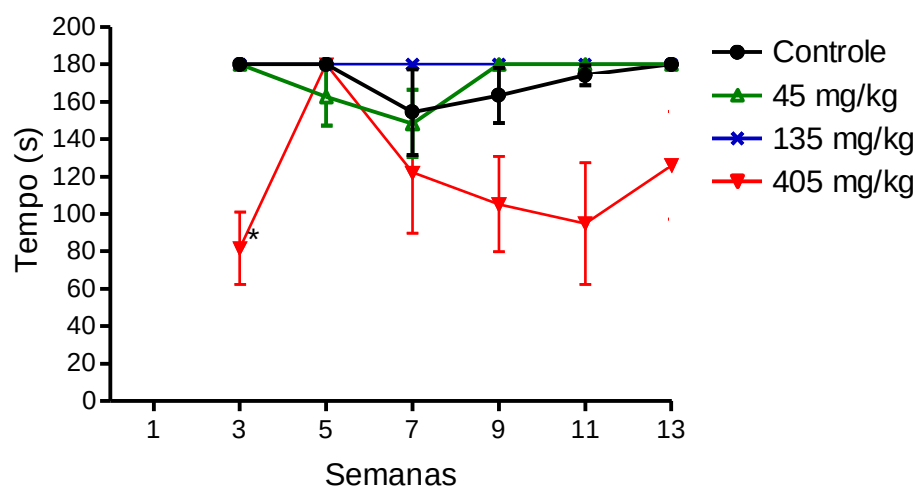
barra giratória, de fêmeas tratadas com a maior dose do extrato (405 mg/kg) durante a terceira semana experimental. Não ocorreram alterações dignas de nota em fêmeas tratadas com as duas menores doses e nem em machos submetidos ao teste (tabela 17 e gráfico 14).

Tabela 17. Efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre a atividade motora de ratos avaliada pelo tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do experimento de *Rota Rod*.

Grupos	Semanas					
	3	5	7	9	11	13
<i>Machos</i>						
Controle	161,5 ±16,8	180,0 (±0,0)	159,4 ±18,4	176,2 ±3,4	165,8 ±12,7	149,0 ±27,8
45 mg/kg	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)
135 mg/kg	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	169,2 ±9,6	168,4 ±10,4	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)
405 mKg	142,6 ±30,2	172,0 ±7,1	101,6 ±34,7	137,2 ±33,2	135,0 ±34,9	180,0 (±0,0)
<i>Fêmeas</i>						
Controle	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	154,6 ±22,7	163,4 ±14,8	174,2 ±5,2	180,0 (±0,0)
45 mg/kg	180,0 (±0,0)	162,8 ±15,4	148,4 ±17,9	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)
135 mg/kg	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)	180,0 (±0,0)
405 mKg	81,8* ±19,4	180,0 (±0,0)	122,2 ±32,2	105,2 ±25,4	95,0 ±32,5	126,2 ±28,7

Os valores expressam a média (± e.p.m.) do tempo de permanência (em segundos) de cada grupo experimental (n=5). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey) em relação ao grupo controle correspondente.

Gráfico 14. Representação gráfica do efeito do tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. sobre a atividade motora de ratas, avaliada pelo tempo de permanência (em segundos) na barra giratória do experimento de *Rota Rod*.



Os valores expressam a média $\pm$ desvio padrão de cada grupo (n=5). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey).

5.3.2 Parâmetros avaliados após o tratamento

Após o tratamento prolongado dos animais com diferentes doses do EE de *Jatropha gossypifolia* L. foram realizadas a análise laboratorial do sangue desses animais e o estudo anatomopatológico de suas vísceras.

5.3.2.1 Análise laboratorial de sangue

As alterações bioquímicas significativas, diagnosticadas pelo presente estudo, foram poucas. Encontrou-se hiperglicemia em machos tratados com a menor dose (45 mg/kg) e elevação dos teores de proteínas totais em machos tratados com 405 mg/kg. Estas alterações parecem reversíveis, pois não ocorreram nos grupos satélites. Como

efeito tardio, observou-se apenas um aumento estatisticamente significativo do ácido úrico em machos satélites da dose de 135 mg/kg; todavia, o valor desse parâmetro permaneceu dentro da faixa de normalidade estabelecida para os animais do biotério (tabela 18, gráficos 15 e 16).

Tabela 18. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar sob tratamento prolongado com diferentes dosagens de *Gossypium hirsutum* L.

Grupos	Parâmetros						
	Glicemia (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ácido Úrico (mg/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)
Machos							
Referência**	76,0 – 98,0	51,0 – 61,0	0,4 – 0,6	0,9 – 1,3	5,1 – 6,8	3,1 – 3,5	2,3 – 2,9
Controle	110,6 ±4,1	24,0 ±1,6	0,4 ±0,0	0,5 ±0,0	6,5 ±0,1	3,5 ±0,2	3,1 ±0,1
45 mg/kg	151,0* ±2,0	21,6 ±1,7	0,3 ±0,0	0,8 ±0,1	6,6 ±0,1	3,6 ±0,0	2,7 ±0,2
135 mg/Kg	126,0 ±12,6	30,0 ±1,5	0,3 ±0,3	0,6 ±0,1	6,4 ±0,1	3,6 ±0,1	2,8 ±0,0
405 mg/kg	107,0 ±2,9	28,3 ±1,9	0,3 ±0,0	0,7 ±0,1	7,3* ±0,0	4,0 ±0,0	3,3 ±0,0
Satélite (135 mg/kg)	94,6 ±9,6	29,3 ±2,3	0,2 ±0,0	1,3* ±0,4	7,0 ±0,1	3,5 ±0,2	3,5 ±0,3
Satélite (405 mg/kg)	126,0 ±9,8	31,5 ±0,2	0,2 ±0,0	0,9 ±0,0	6,9 ±0,0	3,6 ±0,0	3,2 ±0,0
Fêmeas							
Referência**	78,0 – 100,0	52 - 62	0,4 – 0,6	1,2 – 1,6	5,5 – 6,9	3,1 – 3,5	2,3 – 3,0
Controle	100,3 ±4,2	25,3 ±0,5	0,4 ±0,0	0,5 ±0,0	6,9 ±0,3	4,0 ±0,1	2,9 ±0,1
45 mg/kg	129,3 ±9,4	25,0 ±1,2	0,4 ±0,0	0,7 ±0,0	6,8 ±0,1	4,0 ±0,0	2,8 ±0,1
135 mg/Kg	104,0 ±6,1	31,3 ±1,5	0,3 ±0,0	0,6 ±0,0	7,0 ±0,0	3,9 ±0,0	3,0 ±0,0
405 mg/kg	106,0 ±3,8	29,3 ±2,2	0,4 ±0,0	0,6 ±0,0	6,9 ±0,0	4,0 ±0,1	2,9 ±0,1
Satélite (135 mg/kg)	93,6 ±4,0	28,3 ±0,9	0,3 ±0,0	1,1 ±0,0	7,2 ±0,1	4,0 ±0,1	3,1 ±0,0
Satélite (405 mg/kg)	102,0 ±5,1	32,0 ±0,4	0,2 ±0,0	1,0 ±0,1	7,5 ±0,1	4,2 ±0,1	3,2 ±0,0

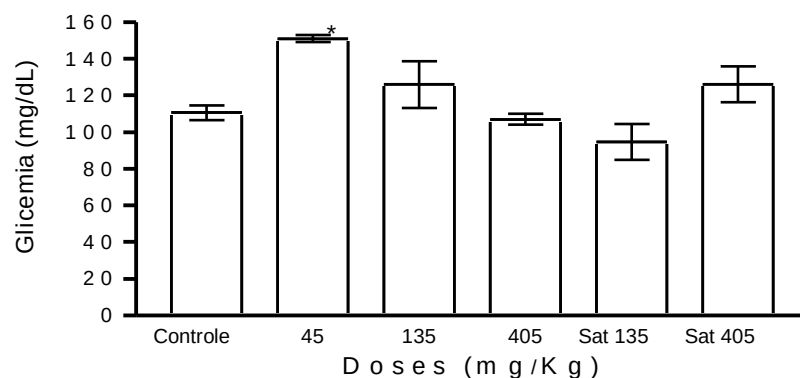
Os valores expressam a média (± e.p.m.) de cada grupo (n=4). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey). **Valores preconizados

Tabela 18. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar sob tratamento prolongado com diferentes dosagens de *Gossypium hirsutum* L. (Continuação).

Grupos	Parâmetros						
	BT (mg/dL)	AST (U/l)	ALT (U/l)	FA (U/l)	Amilase (U/dL)	ãGT (U/l)	CK (U/l)
Machos							
Referência**	-	67 - 89	37 - 59	100 - 131	-	0,4 – 3,4	-
Controle	0,1 ±0,0	141,5 ±25,8	67,5 ±0,3	116,3 ±9,2	893,3 ±59,4	1,5 ±0,3	4.679,3 ±1.079,5
45 mg/kg	0,1 ±0,0	131,0 ±8,9	68,0 ±2,8	108,6 ±6,8	1.104,6 ±55,9	1,3 ±0,2	5.204,3 ±650,4
135 mg/Kg	0,1 ±0,0	120,0 ±4,9	62,0 ±1,6	112,5 ±15,0	833,0 ±38,4	0,7 ±0,2	3.320,6 ±292,7
405 mg/kg	0,1 ±0,0	142,6 ±6,4	103,6 ±11,4	142,3 ±15,8	1.075,0 ±36,4	1,6 ±0,2	3.940,3 ±864,4
Satélite (135 mg/kg)	0,1 ±0,0	131,0 ±3,3	68,6 ±6,2	73,0 ±16,2	697,0 ±111,9	6,0 ±4,2	3.296,0 ±993,2
Satélite (405 mg/kg)	0,1 ±0,0	148,5 ±14,5	86,0 ±2,8	75,0 ±10,6	1.103,5 ±101,7	1,5 ±1,0	3.552,0 ±1.675,8
Fêmeas							
Referência**	-	76 - 100	45 - 61	57 - 101	-	0,0 – 2,2	-
Controle	0,1 ±0,0	111,0 ±3,3	47,6 ±2,5	93,3 ±15,0	819,3 ±14,4	0,0 ±0,0	3.843,6 ±778,1
45 mg/kg	0,1 ±0,0	129,3 ±4,0	89,3 ±18,4	94,3 ±23,3	741,3 ±29,9	2,0 ±0,0	2.848,0 ±429,4
135 mg/Kg	0,1 ±0,0	120,0 ±9,5	58,3 ±8,3	63,3 ±6,9	665,6 ±68,2	3,0 ±0,7	4.624,6 ±694,1
405 mg/kg	0,1 ±0,0	116,3 ±1,4	67,6 ±8,8	106,0 ±36,4	676,3 ±62,4	1,0 ±0,4	3.264,6 ±645,1
Satélite (135 mg/kg)	0,1 ±0,0	109,9 ±8,7	54,3 ±3,4	48,0 ±10,5	810,6 ±98,4	1,0 ±0,0	2.933,3 ±586,4
Satélite (405 mg/kg)	0,1 ±0,0	126,3 ±8,3	79,3 ±7,6	81,0 ±25,5	592,6 ±64,3	1,0 ±0,8	2.257,6 ±604,9

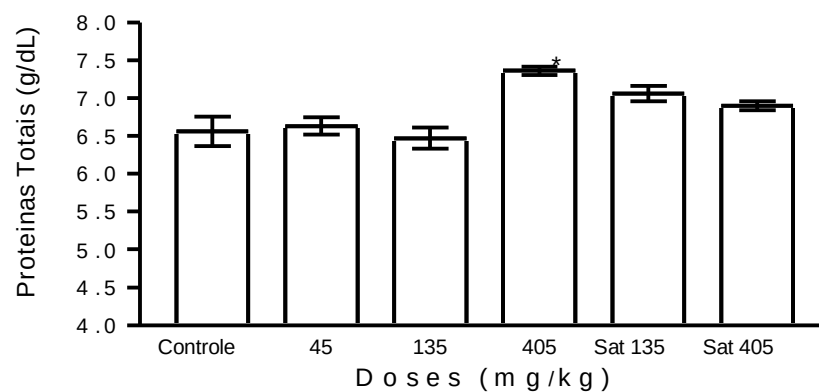
Os valores expressam a média ± e.p.m. de cada grupo (n=4). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey). **Valores preconizados p

Gráfico 15. Glicemia (mg/dL) de ratos machos sob tratamento prolongado (13 semanas), com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Sat: satélite).



Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de cada grupo (n=4). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey).

Gráfico 16. Níveis sanguíneos de proteínas totais (mg/dL) de ratos machos sob tratamento prolongado (13 semanas), com diferentes doses (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Sat: satélite).



Os valores expressam a média $\pm$ e.p.m. de cada grupo (n=4). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey).

A tabela 19 apresenta as principais alterações hematológicas produzidas pelo extrato. Inicialmente, percebe-se uma redução nos valores de hemoglobina e hematócrito de machos tratados com a maior dose (405 mg/kg) que, entretanto, não foi observada nos grupos satélites dessa dose. O volume corpuscular médio (VCM) foi aumentado tanto em machos (405 mg/kg) quanto em fêmeas (135 mg/kg), inclusive nos respectivos grupos satélites. A hemoglobina corpuscular média (HCM) foi elevada em todas as doses (inclusive satélites) de machos e nas duas maiores doses de fêmeas (inclusive no satélite da dose de 135 mg/kg). A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) foi aumentada em machos das 3 doses e em fêmeas tratadas com a maior dose (405 mg/kg). A elevação desse último parâmetro não foi observada nos satélites de ambos os sexos.

No leucograma, observou-se um aumento significativamente diferente do grupo controle, na contagem global de leucócitos de machos satélites da maior dose (405 mg/kg) e aumento de plaquetas entre fêmeas satélites da dose de 135 mg/kg.

Tabela 19. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do EL

Grupos	Parâmetros				
	Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (μ ³)	H
<i>Machos</i>					
Referência**	6,9 – 9,1	14,0 – 15,0	39,0 – 43,0	52,0 – 56,0	18,0
Controle	6,8 ±0,4	14,7 ±0,4	45,2 ±1,8	51,5 ±0,2	
45 mg/kg	7,3 ±0,1	14,5 ±0,2	42,0 ±1,1	53,0 ±0,4	1
135 mg/kg	7,3 ±0,0	13,9 ±0,2	39,7 ±1,3	52,3 ±0,2	1
405 mKg	6,4 ±0,2	12,8* (±0,6)	36,2* ±2,0	55,3* ±0,7	1
Satélite (135 mg/kg)	7,2 ±0,0	13,0 ±0,0	39,9 ±0,1	54,9* ±0,8	1
Satélite (405 mg/kg)	7,7 ±0,0	14,1 ±0,2	43,7 ±0,6	56,6* ±1,2	1
<i>Fêmeas</i>					
Referência**	6,5 – 8,4	12,0 – 15,0	33,0 – 42,0	50,0 – 52,0	18,0
Controle	6,7 ±0,3	14,8 ±0,3	43,7 ±1,1	53,5 ±1,0	
45 mg/kg	6,5 ±0,3	14,3 ±0,1	41,4 ±0,2	55,3 ±0,2	
135 mg/kg	7,1 ±0,0	14,6 ±0,2	41,0 ±0,6	56,6* ±0,7	2
405 mKg	6,6 ±0,1	13,5 ±0,3	37,3 ±0,7	56,0 ±0,4	2
Satélite (135 mg/kg)	7,3 ±0,1	14,5 ±0,5	43,1 ±1,3	59,0* ±0,2	1
Satélite (405 mg/kg)	6,6 ±0,1	12,7 ±0,2	38,1 ±0,7	57,1* ±0,0	

Os valores expressam a média ± e.p.m. de cada grupo (n=4). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey). **Valores preconizados por Melo-Dini

Tabela 19. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar sob tratamento prolongado com diferentes doses (v.o.) do (continuação).

Grupos	Parâmetros				
	Leucócitos (10 ⁶ /mm ³)	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)	Mor
<i>Machos</i>					
Referência**	6,8 – 10,0	13,0 – 27,0	71,0- 84,0	0,0 – 4,0	0,0
Controle	4,3 ±0,4	29,2 ±2,2	65,2 ±2,7	1,2 ±0,2	
45 mg/kg	4,7 ±0,2	20,3 ±1,5	75,6 ±2,7	0,6 ±0,2	
135 mg/kg	6,1 ±0,5	40,6 ±0,2	54,3 ±0,9	1,6 ±0,5	
405 mKg	4,7 ±0,2	33,3 ±3,8	61,6 ±4,0	1,3 ±0,2	
Satélite (135 mg/kg)	4,6 ±0,1	30,5 ±1,7	64,0 ±1,4	2,5 ±1,0	
Satélite (405 mg/kg)	8,3* ±1,4	36,5 ±2,4	55,0 ±0,7	2,5 ±0,3	
<i>Fêmeas</i>					
Referência**	6,2 – 11,0	17,0 – 28,0	65,0 – 78,0	0,0 – 2,0	0,0
Controle	4,3 ±0,7	23,5 ±2,4	71,0 ±4,2	1,0 ±0,0	
45 mg/kg	3,2 ±0,3	27,6 ±3,8	66,6 ±4,2	1,3 ±0,7	
135 mg/kg	2,8 ±0,5	33,6 ±4,4	62,3 ±4,0	1,0 ±0,0	
405 mKg	3,1 ±0,7	32,3 ±6,8	63,0 ±7,0	2,0 ±0,4	
Satélite (135 mg/kg)	3,4 ±0,2	35,5 ±1,7	58,0 ±1,4	3,0 ±0,7	
Satélite (405 mg/kg)	3,3 ±0,2	38,5 ±3,9	57,5 ±3,1	3,0 ±0,7	

Os valores expressam a média ± e.p.m. de cada grupo (n=4). *p<0,05 (ANOVA seguido de Tukey). **Valores preconizados p

5.3.2.2 Estudo anatomopatológico

Trinta dias após o tratamento com o EE de *Jatropha gossypifolia* L., foram observadas em vísceras de alguns animais dos grupos satélites manchas escuras e homogêneas. Esse achado ocorreu em fígado de um macho tratado com 405 mg/kg e em um rim de uma fêmea tratada com 135 mg/kg (figura 18). Ainda constatou-se nódulo adiposo em fígado de um macho satélite da dose de 405 mg/kg (figura 19).



Figura 18. Imagem de ponto escuro em rim de rata Wistar (satélite), 30 dias após o término do tratamento prolongado (13 semanas) com 135 mg/kg do EE de *Jatropha gossypifolia* L.



Figura 19. Imagem de nódulo gorduroso em fígado de rato Wistar (satélite), 30 dias após o tratamento prolongado (13 semanas) com 405 mg/kg do EE de *Jatropha gossypifolia* L.

O exame histopatológico de vísceras (coração, pulmão, fígado e rins) de ratos (machos e fêmeas) submetidos a tratamento prolongado com diferentes doses do EE de *Jatropha gossypifolia* L. evidenciou alterações pouco significativas e apenas entre aqueles tratados com a maior dose (405 mg/kg), como a seguir se descreve.

No fígado, o tratamento prolongado com o extrato avaliado não subverteu a arquitetura lobular, cujas veias hepáticas terminais, com paredes finas, mostravam-se eqüidistantes e com discreta congestão, como ocorreu no tratamento agudo. Os hepatócitos estavam normais, isomorfos, embora, em zona III, tenham-se detectado raros focos de necrose, para os quais houve afluxo linfo-histiocitário (figura 20). Em fêmeas, tais lesões necroinflamatórias eram raras. Estas alterações estavam constantemente associadas à fibrose mínima, como demonstrado pela coloração do vermelho picrossirius e já ilustrado no experimento agudo (figura 9). Nas fêmeas e em alguns machos, foi observado aumento do número de linfócitos portais, que se mesclavam com neutrófilos (figura 21). Não foram observadas lesões na interface porto/parenquimatosa.

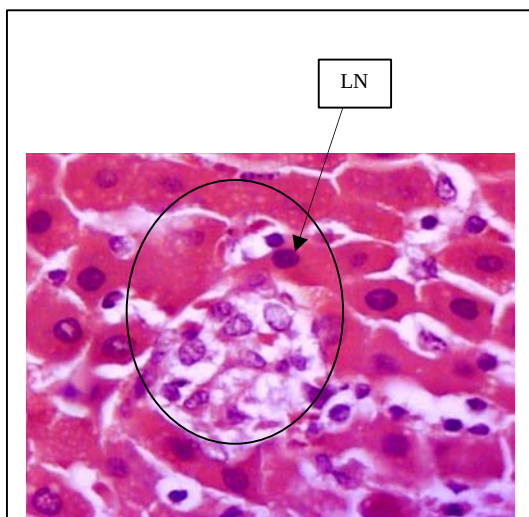


Figura 20. Parênquima hepático de rato tratado durante 13 semanas com 405 mg/kg (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L., mostrando lesão necroinflamatória (LN) (Hematoxilina-eosina - X400).



Figura 21. Portite (PT) em rato tratado durante 13 semanas com 405 mg/kg (v.o.) do EE de *Jatropha gossypifolia* L. (Hematoxilina-eosina - X100).

Nos pulmões de ratos tratados com o EE de *Jatropha gossypifolia* por 13 semanas, a arquitetura lobular mostrava-se preservada com trama alveolar e estruturas bronquiais e bronquiolares bem distribuídas. Os bronquíolos péricios encontraram-se destituídos de cartilagem, irregularmente dicotomizados. Camada basal sem glândulas. Revestimento epitelial ciliado, simples ou pseudoestratificado com núcleos basais e normocromáticos, nas estruturas mais calibrosas, que, ademais, exibiam células mucossecretoras. Células epiteliais especializadas do revestimento brônquico e bronquiolar eram associadas a agregados linfóides e macrófagos. Tais adensamentos linfóides também foram individualizados no interstício margeando vênulas peribronquiolares e em septo interlobular. Os alvéolos apresentaram-se com paredes finas revestidas por pneumócitos tipo I e tipo II. A matriz do septo apresentava, em

extensas áreas para machos e algumas áreas para fêmeas, capilares congestos e exsudação linfocitária promovendo espessamento septal, associado à restrição dos espaços alveolares correspondentes. Os macrófagos intra-alveolares estavam presentes, porém eram escassos e a rede vascular apresentou-se fina e regularmente distribuída.

Nos rins avaliados, os limites corticomedulares estavam bem definidos, sendo a arquitetura histológica do tipo lobular, com pirâmides medulares recobertas por tecido cortical. A córtex exibia glomérulos bem distribuídos, cápsula de Bowman fina, com espaço de retração artefactual, sendo os tufo capilares finos e o mesângio delicado. Os túbulos contorcidos proximais e distais e o segmento de ducto coletor não evidenciaram particularidades histológicas. Similarmente, o padrão histológico habitual ocorreu nas alças de Henle, ductos coletores da pirâmide medular, sistema pielocalicial e as colunas de Bertin da pélvis renal. Ressalte-se a inexistência de reação inflamatória e fibroses matriciais, renais. De modo semelhante ao já relatado no estudo agudo, no tecido adiposo periférico foi constatada adiponecrose focal (exsudação histiocítica, com padrão xantomatoso).

No coração, o tratamento prolongado com o extrato avaliado, inclusive na maior dose experimental, não provocou alterações histopatológicas significativas em ambos os sexos, tendo sido encontradas as mesmas características histológicas relatadas para os animais do estudo toxicológico agudo.

6. DISCUSSÃO

A revisão bibliográfica feita para elaboração deste estudo constou, basicamente, de duas grandes partes. A primeira, onde aspectos diversos sobre a espécie vegetal foram abordados, principalmente: características botânicas, composição química, uso popular e efeitos biológicos (terapêuticos e/ou tóxicos) comprovados. Na segunda parte, pudemos atualizar nossos conhecimentos acerca de aspectos metodológicos e éticos de estudos experimentais para avaliação de toxicidade de medicamentos, em especial de fitoterápicos.

No que concerne à espécie em estudo, *Jatropha gossypifolia* L., foi surpreendente o grande volume de trabalhos encontrados sobre alguns aspectos da planta, principalmente a composição química, em contraste com a quase total inexistência de estudos toxicológicos sistematizados com produtos originados dessa planta e utilizados na medicina popular. Podemos considerar que essa foi a principal motivação para desenvolvimento deste estudo, afinal, essa espécie pode ser compreendida como um exemplo típico do tênue limiar existente entre o terapêutico e o tóxico. Isso, ao considerarmos que, conforme já comentado anteriormente, apesar de ser facilmente encontrada nos compêndios de Toxicologia e Botânica como uma planta tóxica (*in natura*), existem vários relatos de uso, na terapêutica popular, de produtos derivados desse vegetal, sendo que alguns desses efeitos já encontram-se cientificamente comprovados.

As leituras sobre os fundamentos metodológicos e éticos da avaliação de toxicidade sob a óptica da Toxicologia moderna, nos permitiram atentar para aspectos

diversos entre os quais destacamos a necessidade premente de planejar e conduzir estudos experimentais, buscando sempre uma racionalização no uso de animais de laboratório. Ainda se evidenciou uma forte tendência para desenvolvimento de métodos alternativos (*in vitro*), inclusive lançando-se mão de ferramentas toxicogenômicas, para avaliação de toxicidade, apesar do reconhecimento de que a utilização de animais, como roedores e mamíferos, ainda é a melhor forma de antever eventual toxicidade, de dada substância, para a espécie humana.

Também foi possível perceber o crescimento da preocupação de autoridades sanitárias do Brasil com a utilização irracional de medicamentos fitoterápicos pela nossa população. Essa prática, ao longo dos anos, tem se transformado em um grave problema de saúde pública. Tal preocupação se evidencia, em parte, pelas várias regulamentações no que diz respeito ao registro e comercialização de medicamentos fitoterápicos, inclusive com a recente resolução ¹ 90 de 16 de março de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que publica um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos.

Na parte experimental deste estudo, a primeira preocupação foi a de que o produto estudado fosse o mais próximo possível do utilizado pela população e também daquele avaliado pela maioria dos estudos experimentais que têm demonstrado alguma atividade biológica da espécie, principalmente o trabalho de Abreu et al. (2003). Esse estudo relata um significativo potencial hipotensor do extrato etanólico (EE) das partes aéreas (folhas e caule) de *Jatropha gossypifolia* L. Tanto o período do ano escolhido para a realização da coleta, quanto todo o processamento do material vegetal visaram à

obtenção de um extrato, o mais representativo possível, da potencialidade de ação biológica da espécie.

Após a identificação da planta coletada como sendo a espécie que nos propúnhamos a estudar, pudemos confirmar também que aspectos químicos do extrato obtido, como rendimento de extração (7,9%) e principais grupos químicos constituintes (taninos, esteróides e flavonóides) estavam de acordo com o encontrado na literatura (ABREU et al., 20003; MARIZ et al., 2004). Isso nos permitiu dar prosseguimento ao estudo com algumas certezas. Inicialmente que, de fato, estávamos trabalhando com a espécie *Jatropha gossypifolia* L. e ainda que, tanto a coleta do material vegetal, quanto a preparação do extrato haviam sido adequadas, inclusive em termos de sazonalidade, a julgar por aspectos como o rendimento de extração e a confirmação da presença de grupos químicos já conhecidos da espécie.

Os experimentos com os animais foram desenvolvidos dentro de princípios éticos e técnicos atualmente estabelecidos sempre objetivando empregar o menor número possível de animais e minorar o sofrimento desses. Para cada um dos experimentos utilizamos grupos controle, onde os animais eram tratados com água (veículo de ressuspensão do extrato) a fim de observar eventuais alterações orgânicas oriundas do meio ambiente ou do estresse produzido nos animais pela manipulação dos mesmos.

Esses animais não apresentaram alterações consideráveis e, além disso, seus parâmetros orgânicos avaliados numericamente encontraram-se, na grande maioria dos casos, dentro dos valores de referência obtidos por Melo-Diniz (2000) em padronização prévia realizada no Biotério “Prof. Thomas George” do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof Delby Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Esse

foi o mesmo local onde nossos estudos experimentais foram realizados, conforme já mencionado. Os poucos parâmetros de animais controle que destoaram dos valores de referência para os animais do referido biotério apenas reforçam a importância do uso de grupos controle paralelos em cada experimento, tendo em vista que alguns indicadores são sensíveis a variações individuais e/ou sazonais, entre outras.

Esse resultado credenciou os animais do grupo controle a servirem de referência para os animais dos grupos tratados com o extrato, na busca de significância estatística de diferenças encontradas entre esses grupos, em dado parâmetro orgânico. Além disso, toda alteração orgânica estatisticamente significativa foi também avaliada quanto à sua significância clínica utilizando-se, para tanto, os valores considerados normais para a espécie animal em uso. Tais valores são os preconizados por obras de referência e, principalmente, aqueles estabelecidos por Melo-Diniz (2000), por serem mais específicos para os animais utilizados.

Inicialmente, o estudo toxicológico agudo foi conduzido com a dose de 5 g/kg, considerada como dose limite para avaliação toxicológica aguda (LARINI, 1993). O surgimento de efeitos tóxicos significativos nos levou a utilizar, na seqüência dos estudos, outras quatro doses inferiores a 5 g/kg e geometricamente espaçadas, conforme já relatado.

A única dose que não produziu alterações significativas foi a primeira (1,2 g/kg); cerca de 4,8 vezes maior que a maior dose experimental hipotensora nos estudos de Abreu et al. (2003), que foi de 250 mg/kg. Esse dado informa sobre um limite de segurança do produto em termos de toxicidade aguda, embora de modo não exato. Entretanto, a determinação exata de parâmetros de segurança específicos, como a maior

dose que não causa efeito tóxico observável (NOEL – *No Observed Effect Level*), ou a dose máxima tolerada (DMT), apesar de muito importantes em contextos específicos, não era objetivo deste trabalho.

Desde já, ressalte-se que os efeitos observados foram tanto mais frequentes e intensos quanto maior a dose. Associando-se isso ao fato de não terem sido observados no grupo controle e nem na primeira dose experimental (1,2 g/kg) percebe-se que parece haver uma relação entre doses e efeitos tóxicos agudos para o produto avaliado.

Nas demais doses experimentais (a partir de 1,8 g/kg), constatamos que as alterações neurológicas observadas em alguns animais e logo nas primeiras 4 horas após o tratamento foram inespecíficas, apesar da predominância de sinais indicativos de ação depressora no Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente: prostração e ptose palpebral. Ainda, a partir da dose de 1,8 g/kg e também logo nas primeiras 4 horas após o tratamento, foram observadas contorções abdominais e aumento da evacuação. Essa situação de distúrbios gastrintestinais é coerente com o quadro de intoxicação já relatado para outra espécie do mesmo gênero, a *Jatropha curcas* (SCHVARSTMAN, 1992).

Outro fato interessante em todos os animais que morreram ao longo do período de observação (apenas machos das maiores doses) foi o surgimento de paralisia do trem posterior, associado a emagrecimento, como sinais anteriores ao óbito. Esta informação pode ser importante em estudos de *causa mortis* ou de mecanismos de toxicidade. Parece que a contração da musculatura lisa abdominal, observada em altas doses, provocaria não somente cólicas e diarreias, prejudicando a ingesta alimentar (cf. tabela 03 e gráfico 02), como também resultaria em danos neuromusculares graves causando paralisia em toda a região posterior do animal.

Ainda em relação a parâmetros metabólicos avaliados diariamente após o tratamento agudo com o extrato, foi possível observar que em fêmeas tratadas com a maior dose, o produto parece ser capaz de produzir alterações sutis, porém significativas. Constatamos emagrecimento (cf. tabela 01 e gráfico 01) mesmo sem alteração na ingestão alimentar (cf. tabela 03 e gráfico 02) de fêmeas, ou seja, poderíamos supor estarmos diante de “um produto anorexígeno ideal” se não fosse a alta dose em que tal efeito foi observado. Obviamente, experimentos específicos seriam necessários para melhor compreensão de tal efeito e da viabilidade de estudos nesse sentido, inclusive considerando o potencial tóxico do produto. Tais experimentos poderiam investigar, por exemplo, uma possível interferência hormonal do produto, considerando-se que essa redução no peso corpóreo se deu apenas em fêmeas e que tal emagrecimento não tem relação direta com o consumo de alimentos.

A maior sensibilidade dos machos ao extrato retrata-se pelo fato de que apenas esses, e na maior dose do tratamento agudo, sofreram alterações bioquímicas e hematológicas significativas (cf. tabelas 04 e 05). Inicialmente, tem-se uma hipoalbuminemia, quadro que pode ser preliminarmente compreendido pela redução na ingestão de alimentos (cf. tabela 03 e gráfico 02). Todavia, tal condição clínica também pode decorrer de dano hepático grave, considerando-se que a síntese dessa proteína ocorre exclusivamente na célula hepática (MILLER, 1991; KANEKO, 1996; RAVEL, 1997).

Essa hipótese de agravo hepático é reforçada tanto pelas alterações de vísceras (coloração e consistência) já relatadas, quanto pelo aumento da aspartato aminotransferase (AST) em 21,6% do valor de referência (89 U/L), fato que também pode

significar distrofia muscular (inclusive no músculo cardíaco) e embolia pulmonar, além de outras condições clínicas (MILLER, 1991; KANEKO, 1996; RAVEL, 1997).

A hipouremia (valores 35,3% menores que a referência mínima: 51 mg/dL) corrobora o indício de dano hepático grave e/ou caquexia, contudo, é mais usada em associação com a dosagem de creatinina, como prova de função renal, especificamente da filtração glomerular. A elevação da creatinina, como a observada no presente estudo (10% em relação à referência máxima: 0,6 mg/dL), indica dano renal grave considerando-se sua maior velocidade de depuração que a uréia. (MILLER, 1991; KANEKO, 1996; RAVEL, 1997; MELO-DINIZ, 2000).

A elevação do sódio (Na^+), apesar de estatisticamente significativa, foi clinicamente discreta, pois ultrapassou apenas em 1,6% o valor de referência limítrofe para os animais do nosso biotério. Discretas elevações de Na^+ podem refletir desequilíbrio hidro-eletrolítico, como o gerado por diarreias. Todavia, para o potássio (K^+) a elevação em relação ao limite superior dos valores de referência foi de 31,4%. Essa hiperpotassemia pode refletir, além de desequilíbrio hidro-eletrolítico, também alto grau de dano neuromuscular (MILLER, 1991; KANEKO, 1996; RAVEL, 1997; MELO-DINIZ, 2000).

Ainda ressalte-se a redução de amilase entre os machos tratados com a maior dose. Essa enzima participa da digestão de carboidratos de alto peso molecular já na saliva e no estômago. Encontra-se em maior parte no pâncreas, entretanto, a amilase sérica é originada, em grande parte, do fígado. Sua redução pode significar tanto insuficiência pancreática, como ocorre na pancreatite crônica e/ou em tumores pancreáticos, quanto dano hepático (MILLER, 1991; KANEKO, 1996; RAVEL, 1997).

Em relação aos parâmetros hematológicos avaliados, também 14 dias após o tratamento via oral com o extrato em dose única, a única alteração observada foi uma forte redução na contagem global de leucócitos (49,1% em relação à referência mínima que é de $6,8 \cdot 10^3/\text{mm}^3$) sem modificações na contagem diferencial, o que caracteriza leucopenia inespecífica (MILLER, 1991; JAIN, 1993; MELO-DINIZ, 2000).

O exame macroscópico das vísceras (coração, pulmão, fígado e rins) dos animais sobreviventes não detectou alterações dignas de nota; no entanto, em alguns desses animais tratados com a dose de 5 g/kg e que morreram ao longo do experimento (machos) foram constatadas alterações de coloração e consistência em coração, pulmão, fígado e intestino. Estes dados são inespecíficos, pois podem tanto corresponder a indícios de propriedades irritativas e inflamatórias do extrato em vísceras, o que poderia ser relacionado com *causa mortis*, quanto também podem apenas ser consequência de alterações orgânicas *postmortem*, considerando-se que em todos os casos os animais morreram durante a madrugada e só foram necropsiados na manhã do dia seguinte.

Na avaliação histopatológica, a partir dos achados já descritos, é possível afirmar que, em fígado e pulmões de animais sob tratamento agudo com 5 g/kg do produto, ocorreram agressões ao funcionamento desses órgãos, evidenciadas basicamente, por resposta inflamatória e estimulação do sistema imunológico (cf. figuras 6 a 17).

No fígado, o EE de *Jatropha gossypifolia* L. produziu uma moderada congestão passiva venular, sinusoidal e portal e ainda discreta hiperplasia kupfferiana. Nos pulmões, o produto avaliado promoveu pneumonite intersticial crônica em machos e broncopneumonia aguda e edema pulmonar agudo em fêmeas e, em ambos os sexos,

congestão venosa, hiperplasia de tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) e áreas de colapsos parenquimatosos. Nos rins analisados, apesar da normalidade histológica e estrutural, foi possível diagnosticar-se, no tecido adiposo periférico, adiponecrose focal (exsudação histiocítica, com padrão xantomatoso).

Em princípio, esses achados confirmam os indícios de hepatotoxicidade já comentados, além de indicar um potencial de toxicidade pulmonar do produto. Contudo, cabe considerar que tais alterações foram encontradas nos animais tratados com a maior dose experimental (5 g/kg). Essa dose corresponde a 20 vezes a maior dose hipotensora (em ratos) do estudo de Abreu et al (2003). Esse fato aponta para um significado clínico pouco relevante desses dados, que podem ser compreendidos mais como resultado de uma sobrecarga do produto avaliado do que como consequência de uma ação tóxica significativa do extrato.

Em relação à ocorrência de mortes, mais grave dos efeitos tóxicos, constatou-se que o extrato foi letal apenas para alguns animais machos e nas duas maiores doses empregadas: 4,0 g/kg (16,6%) e 5 g/kg (66,6%) (cf. tabela 6). O tempo para o surgimento de mortes (terceiro ao décimo dia após o tratamento) aponta para uma absorção bastante lenta do produto no trato gastrointestinal. Esse fato é compreensível tanto pelo aspecto viscoso do extrato quanto pela ocorrência de intensas diarreias, principalmente nas doses mais altas, o que, por certo, funcionou como um mecanismo de defesa do organismo, aumentando a excreção do produto e retardando (ou impedindo) o seu efeito letal na referida dose.

A análise da letalidade em cada grupo experimental indica que a dose letal mediana (DL_{50}) do produto está entre 4,0 g/kg e 5,0 g/kg para machos e é superior a 5 g/kg para

fêmeas, parecendo estar bem acima do limite de testagem para esse parâmetro estabelecido como 2 g/kg, segundo a maioria dos autores (BARROS; DAVINO, 2003). Sendo assim, a determinação de um valor de DL_{50} mais exato, através de novos experimentos, não seria mero preciosismo, mas sim, um erro em termos de bioética animal. (ANDERSEN et al. 2004; CAZARIN et al., 2004). Além disso, conforme já comentado, a DL_{50} como indicador de toxicidade aguda de xenobióticos tem sido bastante questionada principalmente pelo fato de se prestar apenas à classificação toxicológica do produto (ou substância) sem informar com exatidão sobre a segurança no uso ou exposição a um toxicante. Ainda convém destacar o número de animais, relativamente alto, empregado para determinação deste indicador de toxicidade (BARROS; DAVINO, 2003).

Já há algum tempo, outros indicadores para avaliação de toxicidade aguda têm sido propostos, entre eles destaca-se a Dose Máxima Não Letal (DMNL), ou seja, a maior dose de um produto (ou substância) que não causa mortes entre indivíduos de um grupo experimental (LARINI, 1993). No presente estudo, a indicação da relativa segurança de exposição, aguda e em dose única, ao produto estudado é reforçada pelo alto valor obtido para a DMNL (machos: 2,7 g/kg e fêmeas: 5 g/kg).

Os resultados indicam uma toxicidade aguda oral relativamente baixa para o EE de *Jatropha gossypifolia* L., considerando-se que: uma dose relativamente alta (1,2 g/kg) não causou alterações relevantes em ambos os sexos; os efeitos tóxicos mais significativos só foram observados em machos tratados com a maior dose experimental (5 g/kg), dose essa 20 vezes maior que a provável dose terapêutica do produto e ainda que

indicadores clássicos de avaliação de toxicidade, como DL_{50} e DMNL, foram estimados em valores elevados (MARIZ et al., 2006).

Apesar disso, não ignoramos que os indícios de toxicidade neurológica, hepática, renal e pulmonar foram obtidos com doses que, apesar de elevadas, eram únicas, como convinha aos objetivos desta parte do trabalho. Isso suscitou o questionamento sobre uma eventual permanência desses efeitos e/ou o surgimento de outros quando de um tratamento prolongado com o produto em questão (MARIZ et al, 2006).

No estudo toxicológico crônico, os animais foram tratados com 3 doses do EE de *Jatropha gossypifolia* L., geometricamente espaçadas, conforme estabelece a RE 90 da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004(b)). Como não tínhamos informações de níveis de doses usadas na medicina popular, optamos por trabalhar em uma faixa que compreendesse as doses utilizadas por Abreu et al. (2003) quando da demonstração do efeito hipotensor do produto em questão. Isso por considerarmos que, caso o produto avaliado venha a originar um medicamento fitoterápico, muito provavelmente as doses recomendadas estarão em níveis próximos daqueles em que a ação hipotensora foi obtida. Na expectativa de que efeitos tóxicos significativos surgiriam apenas entre os animais tratados com as duas maiores doses experimentais (135 mg/kg e 405 mg/kg), foram feitos grupos satélites para avaliação da permanência ou reversibilidade de eventuais efeitos tóxicos e ainda, para a verificação do surgimento de efeitos tardios, entre os animais dessas doses.

Nessa fase do estudo, foram pesquisadas alterações tanto em parâmetros orgânicos mensurados durante o tratamento quanto após o período de administração das

doses do extrato. Em se tratando de sinais tóxicos gerais (cf. quadro 10), foram encontrados os mesmos que já haviam sido relatados anteriormente quando da exposição aguda a doses elevadas do extrato etanólico de *Jatropha gossypifolia* L.. Esses efeitos ocorreram em ambos os sexos e em intensidade proporcional à dose. Tais achados parecem confirmar os indícios de toxicidade inespecífica nos sistemas neurológico e gastrointestinal.

A proporcionalidade dose-efeito, bem como a maior sensibilidade de machos ao produto - já relatadas na avaliação da toxicidade aguda - puderam ser confirmadas durante o tratamento crônico, na avaliação de alguns parâmetros. Primeiramente, no mais grave dos efeitos tóxicos: a ocorrência de mortes. Os dados registrados na tabela 7, informam sobre a gravidade do risco à saúde quando da exposição prolongada ao EE de *Jatropha gossypifolia* L., considerando-se que ocorreram mortes já na segunda maior dose experimental (135 mg/kg). Essa dose corresponde àquela em que foi demonstrado experimentalmente o efeito hipotensor da planta, portanto dose que estará próxima à terapêutica caso a espécie venha a ser validada como fitoterápico. Ainda para ressaltar a gravidade destes dados, devemos considerar que a maior dose (405 mg/kg), a qual matou mais de 40% dos machos, é menos que o dobro da maior dose hipotensora do extrato obtida por Abreu et al., (2003).

Essa maior sensibilidade de machos ao produto, bem como a proporcionalidade dose-efeito, voltam a ser observadas em outros parâmetros alterados durante a exposição prolongada. No que concerne a alterações na evolução ponderal, os efeitos do tratamento com o EE de *Jatropha gossypifolia* L. são interessantes. O produto parece aumentar o ganho de peso em doses menores e reduzi-lo em doses maiores sendo

que os machos são mais sensíveis à perda de peso que as fêmeas. Essa afirmação deriva do fato de que, na dose intermediária (135 mg/kg) o produto elevou a evolução ponderal em fêmeas (situação típica da menor dose em todos os animais) e reduziu esse parâmetro em machos, efeito característico da maior dose em ambos os sexos (cf. tabela 08 e gráficos 03 e 04).

Todavia, em outros parâmetros as fêmeas mostraram maior sensibilidade que os machos ao tratamento prolongado com o extrato. O produto aumentou o consumo de água de modo estatisticamente significativo, em poucos momentos durante o experimento e apenas em animais tratados com as maiores doses (tabela 09 e gráficos 05 e 06). Em machos tal elevação se deu apenas entre aqueles tratados com 405 mg/kg e nas duas últimas semanas do experimento. Enquanto isso, em fêmeas, o consumo de água se elevou ao final do tratamento com 135 mg/kg e já no início do tratamento com a 405 mg/kg. Diante desses achados, fica evidente que as elevações esporádicas do consumo de água não foram responsáveis pelo já comentado ganho de peso ocorrido em alguns animais.

O extrato vegetal avaliado produziu alterações sobre o consumo de alimentos que se correlacionam com as mudanças na evolução ponderal dos animais sob experimentação. Entretanto, esse efeito do produto não pode ser considerado como o único responsável pelas modificações no ganho ou perda de peso, considerando-se que, em algumas situações em que se constatou alterações nesse parâmetro, não houve correspondente alteração no consumo de alimentos desses animais.

Ora, se as alterações na curva de evolução ponderal não podem ser explicadas simplesmente pelas mudanças no consumo de água e alimentos, devemos admitir que

outros elementos metabólicos foram alterados de modo significativo pelo extrato avaliado. Principalmente entre machos tratados com a maior dose (405 mg/kg), onde a significativa perda de peso confirma os achados em animais que morreram pelo tratamento agudo.

Outros indicadores do metabolismo animal foram avaliados. Quanto à temperatura corporal, o extrato parece aumentar esse parâmetro no início do tratamento e reduzi-lo ao final da exposição (cf. tabela 11 e gráficos 09 e 10). A hipertermia se deu apenas no início do experimento e somente em machos da dose de 45 mg/kg, enquanto a redução da temperatura corporal ocorreu ao final do tratamento de machos com 45 e 135 mg/kg e de fêmeas com 405 mg/kg. Mas, pode-se afirmar que, apesar das diferenças estatisticamente significativas entre grupos tratados e controle, essas variações de temperatura não possuem importância clínica, pois se deram de modo esporádico e dentro, ou pouco acima, da faixa de normalidade desse parâmetro em ratos que é de 35,9°C a 38,5°C (MELO-DINIZ, 2000; ANDERSEN et al., 2004).

Foi também observado que o extrato pode ser hiperglicemiante, quando administrado de modo prolongado (cf. tabela 12 e gráficos 11 e 12). Nesse aspecto, as fêmeas parecem ser mais sensíveis considerando-se que a dose de 45 mg/kg elevou esse parâmetro em fêmeas no meio do tratamento; enquanto em machos, tal efeito só se observou entre aqueles tratados com a 405 mg/kg no meio e ao final do tratamento. Entretanto, tal elevação pode ser entendida como clinicamente discreta, considerando-se que os valores de referência desse parâmetro para os animais do biotério são: 76 mg/dL a 98 mg/dL (machos) e 78 mg/dL a 100 mg/dL (fêmeas) de acordo com os dados obtidos por Melo-Diniz (2000).

As fêmeas também apresentaram maior sensibilidade ao extrato em termos de alterações comportamentais. No teste do Campo Aberto, observou-se redução do comportamento “levantar” entre fêmeas no início do tratamento com 405 mg/kg (cf. tabela 14 e gráfico 13). No teste de *Rota Rod*, ocorreu redução do tempo de permanência na barra giratória apenas em fêmeas tratadas com 405 mg/kg, no início da exposição (cf. tabela 17 e gráfico 14). Isto confirma a ação depressora do produto sobre o Sistema Nervoso Central, inclusive com redução da atividade motora. Ação esta, já relatada quando da avaliação da toxicidade aguda.

Nos parâmetros avaliados após o término do tratamento crônico, destacamos inicialmente, entre as alterações bioquímicas, a capacidade do extrato em produzir aumento da glicose sangüínea apenas em machos tratados com a menor dose (45 mg/kg). Esse indício de efeito hiperglicemiante em situação de exposição prolongada já havia sido comentado através dos dados da glicemia caudal quinzenal. Todavia, convém lembrar que aqui, a elevação observada teve uma importância clínica bem maior que na glicemia caudal, provavelmente pela maior sensibilidade do método empregado. Destaque-se também que esse efeito não foi observado nos grupos satélites, podendo ser considerado reversível (cf. tabela 18 e gráfico 15).

Sabe-se que os mecanismos que controlam os níveis de glicose sangüínea são complexos e, em alguns casos, apenas parcialmente conhecidos. De qualquer modo, alterações nos valores de glicemia devem ser entendidas inicialmente como sinal de agravo hepático por ser este órgão o regulador primário da glicose no organismo (RAVEL, 1997; KANEKO, 1996). Sendo assim, a realização de experimentos

específicos poderia melhor investigar o(s) mecanismo(s) de ação hiperglicemiante contribuindo para uma interpretação clínica mais exata desse efeito.

A elevação dos níveis de proteínas totais também foi um achado isolado (apenas em machos tratados com 405 mg/kg) e reversível, ou seja, não observado nos grupos satélites (cf. tabela 18 e grafico 16). Além disso, pode-se afirmar que tal elevação foi clinicamente discreta, considerando-se que superou em apenas 7,3% o limite superior da faixa de valores de referência para animais do biotério estabelecida como sendo de 6,8 g/dL (MELO-DINIZ, 2000). Considerando-se que a maior parte das proteínas séricas, tanto albumina quanto globulinas possuem síntese hepática (RAVEL, 1997; KANEKO, 1996), este achado, apesar de inespecífico e clinicamente discreto, também aponta para o potencial hepatotóxico do extrato.

A única alteração bioquímica observada apenas em alguns animais de grupos satélites, que poderia ser entendida como efeito tóxico tardio do extrato, foi a elevação do ácido úrico em machos satélites da dose de 135 mg/kg (cf. tabela 18). No entanto, esse aumento, apesar de estatisticamente significativo, parece não ter importância clínica uma vez que 1,3 mg/dL é exatamente o valor do limite superior de referência para os animais utilizados (MELO-DINIZ, 2000).

A tabela 19 apresenta os parâmetros hematológicos significativamente alterados pelo tratamento com o produto estudado. Inicialmente percebe-se a capacidade do extrato em produzir anemia em animais machos tratados com a maior dose (405 mg/kg), já que a redução nos valores de hemoglobina e hematócrito destes animais foi significativa tanto em termos estatísticos quanto em termos clínicos. Ao considerarmos os limites inferiores dos valores de referência (MELO-DINIZ, 2000), de 14 g/dL para

hemoglobina e 39% para hematócrito, percebemos que a redução desses parâmetros nesses animais foi de 8,5% (hemoglobina) e 7,1% (hematócrito), ou seja, que o extrato produziu uma anemia leve nos referidos animais. Além disso, o quadro foi reversível após o término do tratamento, considerando-se que não foram observadas tais alterações entre os animais do grupo satélite (RAVEL, 1997; KANEKO, 1996).

Os aumentos em índices hematimétricos de animais machos, apesar de estatisticamente significativos, não tiveram relevância clínica por apresentarem valores dentro da faixa de referência para os animais do nosso biotério, isso nos impossibilita de classificar a anemia observada. Em fêmeas, o extrato promoveu aumento nos valores de VCM e HCM acima dos níveis de referência. Entretanto, a importância desse achado é questionável pelo fato de que tais alterações não resultaram de modificações em número de hemácias, hematócrito ou teor de hemoglobina.

Na avaliação de parâmetros sangüíneos do leucograma, foi observada apenas uma leucocitose inespecífica e tardia (grupo satélite) entre animais tratados com a maior dose (405 mg/kg). Essa elevação, todavia, não teve relevância clínica, pois não ultrapassou o limiar superior da faixa de referência estabelecida por Melo-Diniz (2000).

Convém ressaltar, ainda na tabela 19, que o aumento do número de plaquetas em fêmeas foi expressivo tanto em termos estatísticos quanto clínicos (35,3% acima do limiar de referência). Esse achado laboratorial pode significar, entre outras situações, hemorragias e toxicidade esplênica (OLIVEIRA, 1985).

Os achados anatomopatológicos em alguns animais tratados com as duas maiores doses do extrato (cf. figuras 18 e 19) confirmam os indícios de hepatotoxicidade e toxicidade renal, já relatadas no estudo toxicológico agudo e nos comentários acerca de

outros parâmetros avaliados na exposição crônica de ratos ao EE de *Jatropha gossypifolia* L. Note-se, no entanto, que tais efeitos tóxicos foram observados em animais de grupos satélites, portanto, 30 dias após o término do tratamento prolongado com o produto avaliado. Desse modo, fica evidente que os efeitos tóxicos do produto sobre a função hepática e renal podem surgir mesmo de modo tardio.

No que concerne às alterações histopatológicas, a partir dos achados já descritos, pode-se afirmar que em fígado e pulmões apenas de animais tratados com a dose de 405 mg/kg ocorreram, de modo semelhante ao observado no estudo toxicológico agudo, agressões ao funcionamento desses órgãos, evidenciadas basicamente, por resposta inflamatória e estimulação do sistema imunitário.

No fígado, ocorreu portite crônica discreta e focos de necrose tubular, além de fibrose lobular leve em zona 3 e ainda, discretas congestão venular e hiperplasia kupfferiana (cf. figuras 20 e 21). Nos pulmões, observaram-se extensas áreas de pneumonite intersticial crônica, principalmente em machos, além de hiperplasia BALT. Nos rins, o tecido adiposo periférico evidenciava adiponecrose (exsudação histiocítica, com padrão xantomatoso).

Esse quadro, apesar de denotar agressões orgânicas que podem ser consideradas discretas e localizadas, é muito importante pois, informa sobre a reprodutibilidade dos efeitos histotóxicos do produto nos tecidos hepático, renal e pulmonar. Isso porque as alterações produzidas pela maior dose do estudo crônico, na intimidade tecidual, foram muito similares às aquelas observadas quando da intoxicação aguda pela dose de 5 g/kg do EE de *Jatropha gossypifolia* L. Conforme já comentado, esses efeitos corroboram os indícios de hepatotoxicidade apontados pela avaliação de

outros parâmetros desse estudo, além de apontarem para um potencial de toxicidade pulmonar também no tratamento prolongado com o EE de *Jatropha gossypifolia* L.

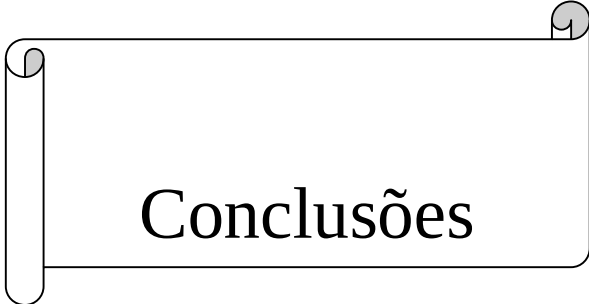
Os resultados obtidos com o tratamento prolongado (13 semanas) de ratos Wistar com o EE de *Jatropha gossypifolia* L., demonstraram a elevada toxicidade crônica desse produto. Essa afirmação se faz, sobretudo, pelos altos percentuais de óbitos em animais tratados com doses (135 mg/kg e 405 mg/kg) muito próximas daquelas em que o efeito hipotensor foi demonstrado (Abreu et al., 2003) e que muito provavelmente corresponderiam ao nível terapêutico caso o produto viesse a ser transformado em um fitoterápico. Ainda vale ressaltar que o estudo toxicológico crônico confirmou os indícios de toxicidade inespecífica observada em sistemas vitais como o hepático, neurológico, renal, pulmonar e gastrointestinal e que já haviam sido relatados na avaliação de toxicidade aguda.

Apesar de que tanto as obras de referência quanto a própria legislação brasileira sobre avaliação de toxicidade de fitoterápicos recomendem, para estudos toxicológicos pré-clínicos, a realização de experimentos com mais de uma espécie de mamíferos (sendo pelo menos uma não roedora), não prosseguimos com a avaliação toxicológica que então seria feita em cães. Tal decisão se deu pelo fato de que mesmo que nenhuma toxicidade aguda ou subcrônica importante fosse produzida em cães, esse fato não reverteria os achados de toxicidade crônica do produto, já observados em ratos. Daí então, estaríamos apenas cumprindo exigências legais, o que se justificaria somente se a finalidade do trabalho fosse de registrar um produto junto aos órgãos sanitários competentes. Como nosso trabalho consta de um estudo com finalidades acadêmicas, a realização de experimentos toxicológicos em cães (ou em outro mamífero não roedor),

diante dos resultados obtidos em ratos, corresponderia a um grave desperdício de recursos vegetais e animais, o que estaria em desacordo com os princípios éticos anteriormente expostos.

Portanto, cremos ser possível afirmar que o extrato etanólico de partes aéreas (folhas e caules) de *Jatropha gossypifolia* L. não é recomendável para o uso terapêutico, como anti-hipertensivo, em virtude dos graves efeitos tóxicos observados em ratos tratados com este produto. Tais efeitos se deram, principalmente, em situação de exposição prolongada ao extrato. Dessa maneira, o mais apropriado seria a aplicação de esforços no sentido de refinar quimicamente esse produto. Sugerimos a obtenção de outros extratos (e/ou frações) com maior seletividade de extração dos constituintes da espécie. Assim, teremos novos produtos que deverão ser submetidos tanto a ensaios farmacológicos para investigação da permanência de efeitos biológicos interessantes para terapêutica, como o hipotensor, quanto para que se demonstre a ausência (ou pelo menos a atenuação) de efeitos tóxicos.

Capítulo IV



Conclusões

7. CONCLUSÕES

Fundamentados nos dados experimentais obtidos, é possível concluir que:

O material vegetal coletado e usado como amostra para preparação do extrato etanólico (EE) de partes aéreas (folhas e caule) de *Jatropha gossypifolia* L. apresentou características botânicas e químicas semelhantes às descritas na literatura para a referida espécie.

O estudo toxicológico pré-clínico agudo em ratos demonstrou que o EE de *Jatropha gossypifolia* L. possui toxicidade aguda (v.o.) relativamente baixa, principalmente considerando-se os elevados valores de dose letal mediana (DL₅₀) e de dose máxima não letal (DMNL) estimados com o produto avaliado.

O estudo toxicológico pré-clínico crônico em ratos demonstrou que o EE de *Jatropha gossypifolia* L. possui significativa toxicidade crônica (v.o.), essencialmente pelos altos percentuais de letalidade associados a outros parâmetros, indicativos de graves danos hepáticos, renais e pulmonares em animais tratados por tempo prolongado com o produto avaliado.

O extrato etanólico de partes aéreas (folhas e caule) de *Jatropha gossypifolia* L. deve ser trabalhado quimicamente para a obtenção de outros extratos (e/ou frações) que sejam avaliados quanto aos seus aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos, em continuidade aos estudos experimentais com essa planta a fim de se obter mais informações sobre a viabilidade da utilização terapêutica dessa espécie.

REFERÊNCIAS

ABDU-AGUYE, I. et al. Acute toxicity studies with *Jatropha curcas* L. Human Toxicology, v. 5, n.4, p.269-274, 1986.

ABREU, I. C.; BORGES, A. C. R. Atividade farmacológica de *Jatropha gossypifolia* L.(Pião-Roxo) na reatividade vascular. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2002, São Luís. Resumos, São Luís: UFMA, 2002. P.17.

ABREU, I. C. et al. Atividade relaxante vascular de *Jatropha gossypifolia* L. (Pião-Roxo). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Annais, Cuiabá, 2002.

ABREU, I.C. et al. Efeito dos extratos de *Jatropha gossypifolia* L., *Passiflora edulis* Sims e *Syzygium jambolanum* D. C. na disponibilidade do cálcio. Revista de Ciências da Saúde, v. 4, n.1, p. 41-46, 2002.

ABREU, I.C. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of the ethanolic extract from *Jatropha gossypifolia* L. in rats. Fitoterapia, v.74, n. p.651-657, 2003.

ABREU, L. T. R. A.; BEZERRA, G.; BORGES, A. C. R. Estudo farmacológico da *Jatropha Gossypifolia* L.. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 2 e SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 1994, São Luís. Sumários dos trabalhos apresentados, São Luís: UFMA, 1994. p.171.

ADESINA, S.K. Studies on some plants used as anticonvulsants in amerindian and african tradicional medicine. Fitoterapia, v.53, p.147-162, 1982.

ADEWUNMI, C.O. Natural products as agents of schistosomiasis control in Nigéria: a review of progress. *International Journal of Crude Drug Research*, v.22, n.4, p.161-166, 1984.

ADEWUNMI, C.O.; ADESOGAN, E.K. Toxicology of some nigerian plants used in schistosomiasis control. I. The effect of molluscicides on molluscan hearts. *Fitoterapia*, v.57, n.5, p.353-358. 1986.

ADEWUNMI, C.O.; MARQUIS, V.O. A rapid *in vitro* screening method for detecting schistosomicidal activity of some nigerian medicinal plants. *International Journal of Crude Drug Research*, v.214, p.157-159. 1983.

_____. Comparative evaluation of the molluscicidal properties of Aridan (*Tetrapleura tetraptera*), Lapalapa Pupa (*Jatropha gossypifolia*), Endod (*Phytolacca dodecandra*) and Bayluscide. *Fitoterapia*, v. 58, n5, p.325-328. 1987.

_____. Evaluation of the effects of environmental factors on molluscicidal properties of Aridan (*Tetrapleura tetraptera*), Lapalapa Pupa (*Jatropha gossypifolia*), Endod (*Phytolacca dodecandra*) and Bayluscide. *Phytotherapy Research*, v.1, n.2, p.69-72. 1987.

_____. Molluscicidal evaluation of some *Jatropha* species grown in Nigeria. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, v.18, p.141-145, 1980.

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H.J.; HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry*, v.23, n.1, p. 129-132, 1984.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 116/96, de 08 de agosto de 1996. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterapêuticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12, ago. 1996.

_____. Resolução RDC nº 48/2004, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. v.53, seção 1, p.39-41.

_____. Resolução RDC nº 90/2004, de 16 de março de 2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004. v. 53, Seção 1, p.34-35.

ALMEIDA, R. N.; CARLINI, E. L. A. Aspectos éticos da experimentação com animais. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia. Fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.62-75.

ALMEIDA, R. N. et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. Revista Brasileira de Farmácia, Rio de Janeiro, v.80, n.3-4, p.72-76, 1999.

AMARAL, D. A.; BARCIA, S. A. D. Intoxicações por medicamentos. In: OGA, S. (org.). Fundamentos de toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. p.369-379.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; MESQUITA, R.K.K. Riscos na utilização de plantas para uso medicinal comercializadas em mercados de São Luís/Maranhão. *Revista de Ciências da Saúde*, v.3, n.1, p. 37-42, 2001.

ANDERSEN, M. L. et al. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP. 2004. 167 p.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M. A. B. F. Modelos animais em psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R. N. *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.53-61.

AUVIN-GUETTE, C. et al. Cyclogossine B, a cyclic octapeptide from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of Natural Products*, v.60, p.1155-1157, 1997.

AWACHIE, P.I.A.; UGWU, F.O. Preliminary investigation of the antimicrobial and Brine Shrimp lethality properties of some nigerian medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy*, v.35, n.5, p.338-343, 1997.

BANERJI, J. et al. Gadain, a lignan from *Jatropha Gossypifolia*. *Phytochemistry*, v.23, n.10, p.2323-2327, 1984.

BARBOSA, B. A invenção do cachorro. *Revista Veja*, ano 33, n. 18, maio, 2000.

BARRETT, B. Medicinal plants of Nicaragua's atlantic coast. *Economy Botany*, New York, v.48, n.1, p.8-20, 1994.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA S. Fundamentos de toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora. 2003. p.57-67.

BATTERSHILL, J.M. Toxicogenomics: regulatory perspective on current position. *Human & Experimental Toxicology*, v.24, n.1, p.35-40, 2005.

BEBAWI, F.F.; CAMPBELL, S.D. Effects of fire on germination and viability of bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*) seeds. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.42, p.1063-1069, 2002.

_____. Impact of fire on bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*) plant mortality and seeding recruitment. *Tropical Grasslands*, v.36, n.3, p.129-137. 2002.

_____. The response of bellyache bush (*Jatropha gossypifolia*) plants cut off at different heights and seasonal times. *Tropical Grasslands*, v.36, n.2, p.65-68. 2002.

BHAT, R.B.; ETEJERE, E.O.; OLADIPO, V.T. Ethnobotanical studies from central Nigeria. *Economic Botany*, New York, v.44, n 3, p.382-390, 1990.

BORGES M.O. R. et al. Atividade antimuscarínica de *Jatropha gossypifolia* L. (pião-roxo). In: CONGRESSO DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL – FESBE, 2001, Caxambu. Resumos, Caxambu, 2001. p.103.

BORTOLETTO, M.E. et al. Análise epidemiológica dos casos registrados de intoxicação humana no Brasil no período de 1985 – 1993. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 9, n.2, p. 1–12. 1996.

BRANDÃO, M.G.L. et al. Qualidade de amostras comerciais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos: drogas inscritas na farmacopéia brasileira. *Infarma*, v.13, n.11/12, p.60-61. 2001.

BRITO, A. S. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994. 122p.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J.B.; SANT'ANA, A.E.G. Evidence for the mechanism of the inhibitory action of jatrophone in the isolated rat uterine muscle. *General Pharmacology*, v. 21, p.117-122. 1990.

_____. Pharmacological analysis of the inhibitory effect of jatrophone, a diterpene isolated from *Jatropha elliptica*, on smooth and cardiac muscles. *Phytotherapy*, v.1, n.3, p.122-126. 1987.

CAMARGO, M. T. L. A. Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros II: estudo etnofarmacobotânico. São Paulo: Ícone. 1998. 232p.

CARBAJAL, D. et al. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 33, p.21-24. 1991.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of Lemograss (*Cymbopogon citratus* Stapf). Effects of teas prepared from leaves on laboratory. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 17, p.37-64. 1986.

CASTRO, A. S. et al. Estudo da atividade analgésica de *Jatropha gossypifolia* (pião-roxo). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2002, São Luís. Resumos, São Luís: UFMA, 2002. p.148.

CAZARIN, K.C.C.; CORRÊA, C.L.; ZAMBRONE, F.A.D. Situação Internacional da Utilização de Animais em Estudos Toxicológicos frente ao Programa 3RS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA, 13., 2003, Londrina, *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, v.16, n.1, p.204, 2003.

_____. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, n.3, p.289-299. 2004.

CENTRAL DE MEDICAMENTOS (CEME). Portaria nº 104 de 29 de dezembro de 1982. Brasília, DF, 1983.

CHARIANDY, C.M et al. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v.64, p.265-270. 1999.

CHATTERJEE, A. et al. Prasanthaline: A New lignan from *Jatropha gossypifolia* Linn. *Indian journal of Chemistry*, v.27B, p.740-741. 1988.

CHATTERJEE, A. et al. Crystal structure of a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*, v.20, n.8, p.2047-2048, 1981.

COE, F. G.; ANDERSON, G. J. Ethnobotany of the Garífuna of eastern Nicaragua. *Economic Botany*, New York, v.50, n.1, p.71-107, 1996.

_____. Screening of medicinal plants used by the Garífuna of eastern Nicaragua for bioactive compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, v.53, p.29-50, 1996.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Legislação e Ética. Resolução 592. Disponível em: <<http://www.meusite.com.br/COBEA/>>. Acesso em 01 ago. 2004.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Resolução nº 251/97. Brasília, DF, 1997.

_____. Resolução normativa nº 01/78 da Câmara Técnica de Medicamentos. Brasília, DF, 1978.

CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R. M. S. Avaliação do risco In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.69-76.

CORRÊA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura / Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v.5, n.2. 1984. p.485.

COSTA, L.C.B. et al. Plantas medicinais mais utilizadas pelas populações rurais da região cacaueira da Bahia. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v.82, n.1/2, p.73-77, 2001.

DAS, B.; ANJANI, G. Gossypidien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*, v. 51, p.115-117, 1999.

DAS, B.; BANERJI, J. Arylnaphthalene lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*, v.27, n.11, p.3684-3686, 1988.

DAS, B.; DAS, R. Gossypifan, a lignan from *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*, v.40, n.3, p.931-932, 1995.

DAS, B.; KASHINATHAM, A. Studies on phytochemicals: Part XVII – Phenolics from the roots of *Jatropha gossypifolia*. *Indian Journal of Chemistry*, v.36B, p.1077-1078, 1997.

DAS, B. et al. Cleomiscosin A, a coumariono-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.31, n.10, p.1189-1191, 2003.

DAS, B.; RAO, S.P.; SRINIVAS, K.V.N.S. Isolation of Isogadain from *Jatropha gossypifolia*. *Planta Medica*, v.62, p. 90, 1996.

DAS, B. et al. Jatrodien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*, v.41, n.3, p. 985-987, 1996.

DAS, B.; VENKATAIAH, B. A minor coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.29, p.213-214, 2001.

DINIZ, D.; GUILHEM, D. O que é Bioética. São Paulo: Brasiliense, 2002. 69p.

DUARTE, D.F.; SANT'ANA, A.E.G.; CALIXTO, J.B. Analysis of the vaso relaxant action of jatrophone in the isolated aorta of the rat: influence of the potassium channel blockers. *European Journal of Pharmacology*, v. 215, p.75-81, 1992.

DUKE, J. A. Handbook of Medicinal Herbs. Flórida: CRC Press, 1985. 253p.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A rote on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association Scientific Edit*, v.16, n.3, 1957.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. v.2.9.

FAUSTMAN, E. M., OMENN, G. S. Risk Assessment. In: KLAASSEN, C. D. (ed.) *Cassaret and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons*. 6.ed. New York: McGraw-Hill, p.83-104, 2001.

FERRIGNI, N.R. et al. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seeds. *Journal of Natural Products*, v.45, n.6, 1982.

GAD, S. C.; WEIL, C. S. Statistics for toxicologists. In: HAYES, A. W. (Ed.). *Principles and methods of toxicology*. New York: Raven Press, 1989. p.435-483.

GASPERI-CAMPANI, A. et al. Seed extracts inhibiting protein synthesis *in vitro*. Biochemical Journal, v.186, p.439-441, 1980.

GBEASSOR, M. et al. Antimalarial effects of eight african medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, v.25, p.115-118, 1989.

GERBRACHT, U.; SPIELMANN, H. The use of dogs as a second species in regulatory testing of pesticides. I. Interspecies comparison. Archives of Toxicology, V.72, n.6, p.319-329, 1998.

GOMES, F. P. Curso de estatística experimental. 11. ed. São Paulo: Nobel, 1985.

GUIROLA, L.; GARCIA, G; TORREALBA, A. Acute renal failure from the ingestion of toxic plants. Veterinary and Human Toxicology, v.34, n.6, p.548, 1992.

GUPTA, M.P.; ARIAS, T.D.; CORREA, M. Ethnopharmacognostic observations on panamanian medicinal plants. Part I. Quarterly Journal of Crude Drug Research, v.17, n.3/4, p.115-130, 1979.

GRAPHPAD PRISM 1999. User's Guide Version 3.0: the fast, organized way to analyze and graph scientific data. San Diego. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em 23 de maio de 2004.

GREAVES, P.; WILLIAMS, A.; EVE, M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. Nature Reviews / Drug Discovery, v. 3, p.226-238, 2004.

HECKER, E. Co-Carcinogenic diterpene esters as principal risk factors in local life style esophageal cancer in Curacao. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, v.55, n.52, p.148-153, 1984.

HORSTEN, S.F.A. et al. Cyclogossine A: a novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia*. *Planta Medica*, v.62, n.1, p.46-50, 1996.

JACOBSON-KRAM, D.; KELLER, K. A. Toxicology testing handbook. New York: Marcel Dekker, 2001.

JAIN, C. N. Essentials of veterinary hematology, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JOSHI, P. Herbal drugs used in Guinea worm disease by the tribals of southern Rajasthan (India). *International Journal of Pharmacognosy*, v.29, n.1, p.33-38, 1991.

KANEKO, J. J. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Academic Press, 1996.

KAVITHA, J.; RAIASEKHAR, D.; SUBBARAJU, G.V. Synthesis of tetradecyl (E)-ferulate, a metabolite of *Jatropha gossypifolia*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v.2, n.1, p.51-54, 1999.

KUMAR, V. P. et al. Search for antibacterial and antifungal agents from selected indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, n. 2, p. 182-188, 2006.

KUPCHAN, S.M. et al. Structure and stereochemistry of Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, v.98, n.8, p.2295-2300, 1976.

KUPCHAN, S.M. et al. Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, v.92, n.14, p.4476, 1970.

LAI, M. W. et al. Annual report of the American Association of Poison Control Centers' national poisoning and exposure database. *Clinical Toxicology*, v.44, p.803-932, 2006.

LANS, C. et al. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, V.1, n.10, 2001.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS / Editora da UFSC. 2000. p.181-196.

LARINI L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. *Toxicologia*. 3.ed. São Paulo: Manole. 1993. p.43-58.

LEAL, C.K.A.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha molissima* (Pohl) Baill.e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.24, n.1, p.5-13, 2005

LE GRAND, A. Les phytothérapies anti-infectieuses de la Forêt Savane, Sénégal (Afrique Occidentale) III: Un résumé des substances phytochimiques et l'activité anti-microbienne de 43 espèces. *Journal of Ethnopharmacology*, v.25, p.315-338, 1989.

LE GRAND, A.; WONDERGEM, P.A. Les phytothérapies anti-infectieuses de la Forêt Savane, Sénégal (Afrique Occidentale) I: Un Inventaire. *Journal of Ethnopharmacology*, v.21, p.109-125, 1987.

LING, L. J.; CLARK, R. F.; ERICKSON, T. B.; TRESTAIL III, J. H. Segredos em toxicologia. Respostas necessárias ao dia-a-dia em *rounds*, no Serviço de Emergência, em exames orais e escritos. Porto Alegre: Artmed, 2005. 368p.

LITCHFIELD, L.T. Jr; WILCOXON, F.A. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.19, p.338-397, 1949.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarium, 2002. 512p.

LU, F. C. Toxicologie –Données générales, procédures d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque. Paris: Masson, 1991. 361p.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Studies on the pharmacological activity of amazonian Euphorbiaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v.22, p.143-172, 1988.

MANSUR, J.; MARTZ, R.M.W. ; URLINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of *Cannabis sativa* and (-) ⁹-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in open-field arena. *Psychopharmacology*, v.9, p.388-397, 1971.

MARIZ, S. R. et al. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n. 3, p.372-378, 2006.

MARIZ, S.R. et al. Avaliação preliminar de casos de intoxicação humana registrados em Hospitais de São Luís-MA. Cadernos de Pesquisa, v.12, n.1/2, p.18-27, 2001.

MARIZ, S. R. et al. Potencial terapêutico e risco toxicológico de *Jatropha gossypifolia* L.: uma revisão. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 18., 2004, Manaus. Resumos. Manaus, 2004.

MARTINI, L.H. et al. Compounds extracted from *Phyllanthus* and *Jatropha elliptica* inhibit the binding of (3H) glutamate and (3H) 6MP-PNP in rat cerebral cortex membrane. Neurochemical Research, v.25, p.211-215, 2000.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC. 1997.

_____(org.). Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Editora UFC, 2004.

MELO-DINIZ, M. F. F. M. Estudos de toxicidade pré-clínica de extratos de folhas de *Cissampelos sympodialis* Eich. 147 f. 2000. Tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Journal of Medical Plant Research, v.45, p.31-34, 1982.

MICHALANY, J. Técnica Histológica em Anatomia Patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3.ed. São Paulo: Michalany, 1998. 295 p.

MILLER, O. Laboratório para o Clínico. 7.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. 593p.

MORAIS, L.C.S.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. *Journal of Ethopharmacology*, v.62, p.57-61, 1998.

MORTON, J.F.A Survey of medicinal plants of Curaçao. *Economic Botany*, v.22, p.87-102, 1968.

NETTO, S. M. Animais de laboratório. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia. fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.46-52

NORHANOMA, W.; YADAV, M. Tumour promoter activity in Malaysian Euphorbiaceae. *British Journal of Cancer*, v.71, n.4, p.776-779, 1995.

OBATOMI, D.K.; BIKOMO, E.O.; TEMPLE, V.J. Anti-diabetic properties of the African mistletoe in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.43, p.13-17, 1994.

OBEREMM, A.; ONYON L.; GUNDERT-REMY, U. How can toxicogenomics inform risk assessment? *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.207, n.2 (suppl), p.592-598, 2005.

OGBOBE, O.; AKANO, V. The physico-chemical properties of the seed and seed oil of *Jatropha gossipifolia*. Plant Foods for Human Nutrition, v. 43, n.3, p.197-200, 1993.

OJEWOLE, J.A.O.; ODEBIYI, O.O. Mechanism of the hypotensive effect of tetramethylpyrazine, an amide alkaloid from the Stem of *Jatropha podagrica*. Planta Medica, v. 41, p. 281-287, 1981.

_____. Neuromuscular and cardiovascular actions of Tetramethylpyrazine from the stem of *Jatropha podagrica*. Planta Medica, v. 38, p. 332-338, 1980.

OKUYAMA, E. et al. Pharmacologically active components of a peruvian medicinal plant, huanarpo (*Jatropha cillata*). Chemical & Pharmaceutical Bulletin, v. 44, p.333-336, 1996.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1998. 412 p.

OLIVEIRA, H. P. Hematologia clínica. 3.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1985. 606 p.

OLOWOKUDEJO, J. D. Comparative epidermal morphology of West African species of *Jatropha* L. (*Euphorbiaceae*). Botanical Journal of the Linnean Society, v.111, p.139-154, 1993.

PAES, A.M.A.; BORGES, A.C. R.; ROCHA, M. O. Efeito do tratamento subagudo da *Jatropha gossypifolia* L. (pião-roxo) na musculatura lisa. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE FARMACÊUTICOS, 1., 1995, São Paulo, Programação e Trabalhos Científicos, São Paulo, 1995. p.29.

PAES, A.M.A.; ROCHA, M.O.; BORGES, A.C. R. Análise farmacológica dos efeitos da *Jatropha gossypifolia* L. (pião-roxo) na pressão arterial e musculatura lisa uterina. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis, Programa e Resumos, Florianópolis, 1996, p.108.

PAIXÃO, R.L., SCHRAMM, F.R. Ethics and animal experimentation: what is debated? Cadernos de Saúde Pública, v.15, Sup. 1, p.99-110, 1999.

PAPARELLA, M.; FASSOLD, E. The challenge to reduce animal testing in regulatory toxicology. Example: The biocidal products directive (BPD) Pharmacology, v.72, n.2, p.151, 2004.

PARKINSON, C.; GRASSO, P. The use of the dog in toxicity tests on pharmaceutical compounds. Human & Experimental Toxicology, v.12, n.2, p.99-109, 1993.

PARKINSON, C.; LUMLEY, C.E.; WALKER, S.R. The value of information generated by long-term toxicity studies in the dog for non clinical safety assessment of pharmaceutical compounds. Fundamental and Applied Toxicology, v.25, n.1, p.115-123, 1995.

PAUMGARTTEN, F.J.R. Risk assessment for chemical substances: the link between toxicology and public health. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.9, n.4, p.439-447, out-dez.1993.

POGNAN, F. Genomics, proteomics and metabonomics in toxicology: hopefully not 'fashionomics'. Pharmacogenomics, v.5, n.7, p.879-893, 2004.

PRAKASH, A. O. Potentialities of some indigenous plants for antifertility activity. *International Journal of Crude Drug Research*, v.24, n.1, p.19-24, 1986.

PRASAD, Y. R.; ALANKARARAO, G. S. J. G.; BABY, P. Constituents of the seeds of *Jatropha gossypifolia*. *Fitoterapia*, v.64, n.4, p.376, 1993.

PURUSHOTHAMAN, K. K.; CHANDRASEKHARAN, S. Jatrophenones A and B, new diterpenoids from the roots of *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) – crystal structure analysis of Jatrophenone B. *Tetrahedron Letters*, n. 11, p.979-980, 1979.

RAVEL, R. Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos achados laboratoriais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RAVINDRANATH, N. et al. Jatrophenone, a novel macrocyclic bioactive diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.51, n.7, p.870, 2003.

REYNOLDS, V. L. Applications of emerging technologies in toxicology and safety assessment. *International Journal of Toxicology*, v.24, n.3, p.135-137, 2005.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicological Sciences*, v.85, n.2, p.809-822, 2005.

ROCHA, M. O. et al. Avaliação toxicológica do tratamento sub-crônico com extrato de *Cecropia adenopus* Mart., *Sechium edule* e *Jatropha gossypifolia* L. nos compostos bioquímicos do sangue. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 47., 1995, São Luís. Anais. São Luís, 1995. p.506.

RODRIGUES, L. D. Fundamentos filosóficos. João Pessoa: Idéia, 2002. 127p.

ROJAS, N. M.; ACOSTA, S. Potenciales antitumorales en extractos acuosos de plantas cubanas. II. Revista Cubana de Farmacia, v14, p.219-225, 1980.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade aguda. In: ALMEIDA, R. N. (org.) Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.124-130.

SAHA, J. C.; SAVINI, E. C.; KASINATHAN, S. Ecboic properties of Indian medicinal plants. Indian Journal of Medical Research, v.49, n.1, p.130-151, 1961.

SCHVASRSTMAN, S. Plantas venenosas e animais peçonhentos. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1992.

SIEVERS, A. F. et al. Inseticidal tests of plants from tropical America. Journal of Economic Entomology, v.42, n.3, p.549-551, 1949.

SILVA, A. M.; BRUM, R. L.; CALIXTO, J. B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. Life Sciences, v.57, p. 863-871, 1995.

SILVA, I. S. Euphorbiaceae da Caatinga: distribuição de espécies e potencial oleaginoso. 1998. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SILVA, S. M. et al. Antagonismo não competitivo de frações obtidas de *Jatropha gossypifolia* L. (pião-roxo) no músculo liso intestinal. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, 14., 2002, São Luís, Resumos. São Luís, 2002. p.195.

SILVA, S. M. et al. Avaliação farmacológica de *Jatropha gossypifolia* L. (pião-roxo) na reatividade do músculo liso intestinal. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. Programa e Resumos. Cuiabá, 2002.

SINGH, A.; AGARWAL, R. A. Possibility of using latex of Euphorbiales for snail control. The Science of the Total Environment, v. 77, p.231-236, 1988.

SINGH, D.; SINGH, A. Piscicidal effect of some common plants of India commonly used in freshwater bodies against target animals. Chemosphere, v.49, n.1, p. 45-49, 2002.

_____. The toxicity of four native Indian plants: effect on AChE and acid/alkaline phosphatase level in fish *Channa marulius*. Chemosphere, v.60, n.1, p. 135-140, 2005.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS (SINITOX). Tabela 10. Evolução dos casos registrados de intoxicação humana por agente tóxico e evolução, Brasil. 2004. Disponível em <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em 09 fev. 2007.

SPIELMANN, H.; GERBRACHT, U. The use of dogs as second species in regulatory testing of pesticides. Part II: subacute, subchronic and chronic studies in dog. Archives of Toxicology, v.5, p.1-21, 2001.

SUBRAMANIAN, S. S.; NAGARAJAN, S.; SULOCHANA, N. Flavonoids of the leaves of *Jatropha gossypifolia*. *Phytochemistry*, v.10, p.1690, 1971.

SUKUMARAN, D.; PARASHAR, B. D.; RAO, K. M. Toxicity of *Jatropha gossypifolia* and *Vaccaria pyramidata* against freshwater snails vectors of animal schistosomiasis. *Fitoterapia*, v.66, n.5, p.393-398, 1995.

SULTANBAWA, M. U. S. et al. Chemical investigation of ceylonese plants. Part XXIX. A survey of plants of Sri Lanka (Ceylon) for alkaloids I. *Lloydia*, v.41, n.6, p.597-631, 1978.

TAYLOR, M. D. et al. New antileukemic Jatrophone derivatives from *Jatropha gossypifolia*: structural and stereochemical assignment through nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v.105, p.3177- 3183, 1983.

TAYLOR, R. S. L. et al. Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, v.53, p.97-104, 1996.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. *Compêndio de Fitoterapia*. Curitiba: Herbarium, 1994. 268 p.

TINTO, W. F.; JOHN, L. M. D. Triterpenoids of *Jatropha gossypifolia*. *Journal of Natural Products*, v.55, n.6, p.807-809, 1992.

TREBIEN, E. A. et al. Evaluation of pharmacological activity of a crude hydroalcoholic extract from *Jatropha elliptica*. *Phytoterapy Research*, v.2, p. 115-118, 1988.

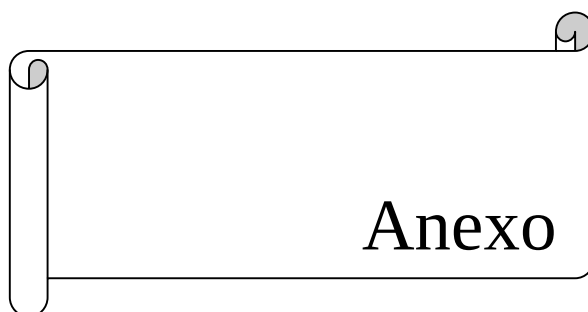
TUROLLA, M. S. R. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. 131p., 2004. Dissertação (Mestrado em toxicologia e análises toxicológicas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

VILLAR, A.; PAYA, M.; TERCENIO, M. C. Plants with antihypertensive action. *Fitoterapia*, v. 57, p. 131-145, 1986.

VITELLI, J. S.; MADIGAN, B. A. Evaluation of a hand-held burner for the control of woody weeds by flaming. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v.44, p.75-81, 2004.

WENIGER, B. et al. La médecine populaire dans le plateau central d'Haiti. 2 Inventaire ethnopharmacologique. *Journal of Ethnopharmacology*, v.17, p.13-30, 1986.

ZANINI, A. C.; CARVALHO, M. F. Definições, conceitos e aspectos operacionais utilizados em farmacovigilância. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37,n.3, 2001.



Anexo A – Resolução ANVISA RE 1 9º, de 16 de março de 2004



34

ISSN 1677-7042

Diário Oficial da União - Seção 1

Nº 53, quinta-feira, 18 de março de 2004

Parte usada	Casca		Dose Diária	Crianças acima de 6 anos: 4-16mg de gengibreis; adulto: 16-32mg de gengibreis
Padronização/Marcador	Cascaroides A		Via de Administração	Oral
Formas de uso	Extrato, tintura		Restrição de uso	Venda sem prescrição médica
Indicações / Ações terapêuticas	Constipação ocasional			
Dose Diária	20-30 mg cascaroides A			
Via de Administração	Oral			
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica			
Nomenclatura botânica	Solanum elaeagnifolium	13	Nomenclatura botânica	Valeriana officinalis 129
Nome popular	Salicete branco		Nome popular	Valeriana
Parte usada	Casca		Parte usada	Raízes
Padronização/Marcador	Salicina		Padronização/Marcador	Sesquiterpenos (ácido valerenico, ácido scotonevalerenico)
Formas de uso	Extrato		Formas de uso	Extrato, tintura
Indicações / Ações terapêuticas	Antiespasmódico, antinfiamatório, analgésico		Indicações / Ações terapêuticas	Insônia leve, sedativo, ansiolítico
Dose Diária	60-120 mg de salicina		Dose Diária	0,8-0,9 mg de sesquiterpenos
Via de Administração	Oral		Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica		Restrição de uso	Venda com prescrição médica
Nomenclatura botânica	Senna alexandrina Mill.	14	Nomenclatura botânica	Mikania glomerata Sprengel 130
Nome popular	Sena		Nome popular	Guaco
Parte usada	Folhas e frutos		Parte usada	Folhas
Padronização/Marcador	Derivados hidroxiantracênicos (calculados como senosídeo B)		Padronização/Marcador	cumarinas
Formas de uso	Extrato		Formas de uso	Extrato, tintura
Indicações / Ações terapêuticas	Expectorante		Indicações / Ações terapêuticas	Expectorante, broncodilatador
Dose Diária	10-30 mg de derivados hidroxiantracênicos (calculados como senosídeo B)		Dose Diária	0,95-4,89 mg de cumarina
Via de Administração	Oral		Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica		Restrição de uso	Venda sem prescrição médica
Nomenclatura botânica	Serenoa repens (Bartlett) J.R. Small	15	Nomenclatura botânica	Hamamelis virginiana 131
Nome popular	"Saw palmetto"		Nome popular	Hamamelis
Parte usada	Frutos		Parte usada	Folha
Padronização/Marcador	Ácidos graxos		Padronização/Marcador	Flavonóis
Formas de uso	Extrato		Formas de uso	Extrato, tintura
Indicações / Ações terapêuticas	Hiperplasia benigna da próstata		Indicações / Ações terapêuticas	Hemorroides - uso interno; hemorroides externas, equimoses - uso externo
Dose Diária	277mg a 304 mg de ácidos graxos		Dose Diária	160-330 mg tinturas
Via de Administração	Oral		Via de Administração	Oral e tópica
Restrição de uso	Venda sob prescrição médica		Restrição de uso	Venda com prescrição médica
Nomenclatura botânica	Symphoricarpos officinalis L.	16	Nomenclatura botânica	Polygala senega 132
Nome popular	Comfrey		Nome popular	Polygala
Parte usada	Partes aéreas e raízes		Parte usada	Raízes
Padronização/Marcador	Alantoina		Padronização/Marcador	Saponinas triterpênicas
Formas de uso	Extrato		Formas de uso	Extrato, tintura
Indicações / Ações terapêuticas	Cicatrizante		Indicações / Ações terapêuticas	Bronquite crônica, faringite
Dose Diária	Preparação com 5% a 20% da droga seca		Dose Diária	18-33 mg de saponinas triterpênicas
Via de Administração	Tópico		Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica. Utilizar por no máximo 4-6 semanas / uso		Restrição de uso	Sem prescrição médica
Nomenclatura botânica	Tinospora cordifolia Sch. Bip.	17	Nomenclatura botânica	Eucalyptus globulus 133
Nome popular	Tinacato		Nome popular	Eucalipto
Parte usada	Folhas		Parte usada	Folhas
Padronização/Marcador	Parthenolides		Padronização/Marcador	Cineol
Formas de uso	Extrato, tintura		Formas de uso	Óleo, extrato, tintura
Indicações / Ações terapêuticas	Profilaxia da toxocarose		Indicações / Ações terapêuticas	Antiespasmódico e anestésico das vias aéreas superiores; expectorante
Dose Diária	0,2-1 mg de parthenolides		Dose Diária	14 - 42,5 mg cineol
Via de Administração	Oral		Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sob prescrição médica		Restrição de uso	Sem prescrição médica
Nomenclatura botânica	Zingiber officinale Rosc.	18	Nomenclatura botânica	Arnica Montana 134
Nome popular	Gengibre		Nome popular	Arnica
Parte usada	Rizomas		Parte usada	Sumidades floridas
Padronização/Marcador	Gingeróis (6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, capsaicina)		Padronização/Marcador	Lactonas sesquiterpênicas totais
Formas de uso	Extrato		Formas de uso	Extrato, tintura
Indicações / Ações terapêuticas	Profilaxia de náuseas causada por movimento (cinetose) e pós-cinéticas		Indicações / Ações terapêuticas	Equimoses, hematomas, contusões em geral
			Dose Diária	Tintura: 1 mg/ml de lactonas sesquiterpênicas, diluir de 3 a 10x; Crenas e pomadas : 0,20-0,25 mg/mg de lactonas sesquiterpênicas
			Via de Administração	Tópica
			Restrição de uso	Venda sem prescrição; não usar em ferimentos abertos

RESOLUÇÃO-RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004

O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria nº 13, de 16 de janeiro de 2004,

considerando o disposto no art.111, inciso II, alíneas "a" e "b" do Regulamento Interno, aprovado pela Portaria nº 193, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000,

considerando que a matéria foi submetida a apreciação da Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 8 de março de 2004, resolve:

Art. 1º Determinar a publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRE-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS", anexo.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DAVI RUMEL

ANEXO

GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRE-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS

1. Considerações gerais:

1. Este guia tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica de acordo com a Resolução vigente para registro e renovação de registro de fitoterápicos.

2. Os estudos de toxicidade devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento

fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido.

II. Toxicidade aguda

Analisa a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas

1. Espécie animal - deve ser usada uma espécie de mamífero evitando-se animais com características genéticas especiais.

2. Sexo - devem ser utilizados machos e fêmeas;

3. Grupos e número de animais por teste (controle e tratado):

No mínimo 6 machos e 6 fêmeas,

por dose do produto;

4. Idade - os animais devem estar em idade adulta;

5. Via de administração - deve ser utilizada a mesma via

proposta para o uso do produto.

6. Doses - suficientes para observação de possíveis efeitos

adversos a estimativa de DL50



(dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais). Se não forem observados efeitos adversos, utilizar a dose máxima posível.

7. Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas devem ser anotados. Deve ser observado o maior número possível de parâmetros, tais como alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com posível causa de morte e respectivo exames histopatológicos.

8. Período da observação - Durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração, prazo que pode ser ampliado dependendo do aparecimento de sinais de toxicidade, visando observar reversão ou não destes sinais. Desde a 24ª hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser observados a variação de peso e o consumo de alimentos. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e autopsiados. Caso sejam observadas alterações nas autopsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem ser realizados.

III. Toxicidade de doses repetidas (longa duração)

Avalia a toxicidade após a exposição a doses repetidas.

1. Espécie animal - devem ser usadas pelo menos duas espécies de mamíferos, sendo uma roedor e uma não-roedor. As linhagens devem ser definidas evitando-se animais com características

genéticas especiais.

2. Sexo - devem ser utilizados machos e fêmeas;

3. Grupos e número de animais por teste.

Rodores: No mínimo 10 machos e 10 fêmeas, por dose do produto.

Não-roedores: no mínimo 3 machos e 3 fêmeas, por dose do produto.

Para cada estudo incluir um grupo controle com o veículo da formulação.

4. Idade - os animais devem estar em idade adulta jovem.

5. Via de administração - deve ser utilizada a mesma via proposta para o uso do produto.

6. O período da administração do produto nos animais segue relação com o período proposto para utilização terapêutica, conforme tabela abaixo:

Período de uso	Duração mínima do estudo das doses repetidas
Até 30 dias de uso por ano	4 semanas
Acima de 30 dias de uso por ano	12 semanas

7. Doses - no mínimo três, a saber, a dose que produza o efeito terapêutico (menor dose), a maior dose que produza um efeito adverso detectável, limitada pelo volume da dose, e uma dose intermediária, por exemplo a média geométrica entre a dose maior e menor dose.

8. Parâmetros a serem observados nos grupos experimentais e no grupo controle tratado com o veículo, tais como: alterações comportamentais, variação do peso corpóreo (semanal), o hemograma completo e análises bioquímicas de sangue (sódio, potássio, gama-glutamilttransferase, aminotransferase, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais e bilirrubina);

9. Exames histopatológicos

Exames macroscópicos devem ser realizados em todos os animais para todas as doses. Os exames histopatológicos devem ser realizados obrigatoriamente nos animais tratados com a maior dose. O material retirado dos animais deve ser mantido em estado de conservação por até cinco anos. Na ausência de alterações histopatológicas nos animais tratados com a maior dose e de alterações macroscópicas com as doses menores, torna-se desnecessária a realização de exames histopatológicos para as demais doses baixas e intermediárias.

Recomenda-se que sejam analisados macro e microscópicamente os órgãos abaixo relacionados:

figado, rins, pulmão, coração, estômago e intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, adrenal, tireoide.

IV. Estudo especial - Genotoxicidade

Estudo que deve ser efetuado quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado do medicamento em humanos.

1. Avaliação in vitro da reversão de mutação em bactérias incluindo ativação metabólica ou de dano a cromossomos de células de mamíferos ou de linfoma de camundongo;

2. Avaliação in vivo do dano em cromossoma em células hematopoéticas de roedores (teste de micronúcleos)

V. Avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico:

Cumprir o disposto nos itens II, III, e quando indicado IV, além de realizar os seguintes testes adicionais:

1. Sensibilização dérmica
2. Irritação cutânea
3. Irritação ocular

RESOLUÇÃO-RE Nº 91, DE 16 DE MARÇO DE 2004

O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria nº 13, de 16 de janeiro de 2004,

considerando o disposto no art. 111, inciso II, alínea "a" § 3º do Regulamento Interno, aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000,

considerando que a matéria foi submetida à apreciação da Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 8 de março de 2004, resolve:

Art. 1º Determinar a publicação da "GUIA PARA REALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES, INCLUSÕES, NOTIFICAÇÕES E CANCELAMENTOS PÓS REGISTRO DE FITOTERÁPICOS", anexo.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DAVI RUMEL

ANEXO

GUIA PARA REALIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES, INCLUSÕES, NOTIFICAÇÕES E CANCELAMENTOS PÓS-REGISTRO DE FITOTERÁPICOS

1. Considerações gerais

Esse guia tem por objetivo classificar as alterações e inclusões da etapa de pós-registro de medicamentos e estabelecer a documentação e os senários exigidos pela ANVISA.

Todas as alterações e inclusões devem ser aprovadas pela ANVISA previamente à sua realização por parte do fabricante.

Cada alteração, inclusão, notificação e cancelamento devem ser apresentados separadamente, acompanhada da documentação pertinente.

Nos casos de alterações e inclusões não previstas neste Guia ou que não satisfaçam a algum dos critérios estabelecidos, fica a critério da ANVISA estabelecer os testes e a documentação que deverão ser apresentados.

As notificações contidas neste guia não são objeto de publicação em DOU.

2. Alterações pós-registro

2.1. Alteração de nome comercial

Será exigida a seguinte documentação:

2.1.1. via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção quando for o caso;

2.1.2. FPI e FP2 devidamente preenchidos;

2.1.3. justificativa técnica referente a solicitação, conforme disposto na legislação vigente;

2.1.4. declaração de não comercialização do produto, quando cabível.

2.1.5. novos textos de bula, rótulo e/ou cartucho, adequados ao novo nome comercial.

2.2. Alteração do prazo de validade

Será exigida a seguinte documentação:

2.2.1. via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção quando for o caso;

2.2.2. FPI e FP2 devidamente preenchidos;

2.2.3. justificativa técnica referente a solicitação;

2.2.4. em caso de ampliação do prazo de validade, relatório técnico com os resultados e avaliação do teste de estabilidade de longa duração referente a três lotes da maior e menor concentração, quando aplicável, conforme o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS.

2.2.5. novos textos de bula, adequados ao novo prazo de validade.

2.3. Alteração nos cuidados de conservação

Será exigida a seguinte documentação:

2.3.1. via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção quando for o caso;

2.3.2. FPI e FP2 devidamente preenchidos;

2.3.3. justificativa técnica referente a solicitação;

2.3.4. relatório técnico com os resultados e avaliação do teste de estabilidade de longa duração referente a um lote da maior e da menor concentração, quando aplicável, conforme o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS;

2.3.5. novos textos de embalagem secundária e bula, adequados aos novos cuidados de conservação.

2.4. Alteração na especificação da matéria prima vegetal

Este item trata da mudança no teor e ou tipo de marcador, no tipo de solvente e/ou na correlação droga/extrato da matéria prima vegetal usada como ativo.

Será exigida a seguinte documentação:

2.4.1. Documentação emitida pela empresa;

2.4.1.1. Via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção, quando for o caso.

2.4.1.2. FPI e FP2 devidamente preenchidos.

2.4.1.3. Justificativa técnica referente a solicitação.

2.4.1.4. Relatório técnico com os resultados e avaliação do teste de estabilidade acelerada referente a um lote da maior e menor concentração, quando aplicável, conforme o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE.

2.4.1.5. Laudos do controle de qualidade do produto acabado anterior e posterior à alteração para verificação da manutenção das características do medicamento aprovadas no registro.

2.4.2. Documentação emitida pelo fabricante da matéria prima vegetal.

2.4.2.1. Dados gerais da empresa fabricante, com o endereço completo do local de fabricação da matéria prima vegetal.

2.4.2.2. Relação dos solventes utilizados no processo de obtenção da matéria prima vegetal;

2.4.2.3. Cópia do certificado de análise;

2.4.2.4. Apresentar o método analítico devidamente validado, ou cópia da monografia correspondente.

2.5. Alteração do local de fabricação

Configuram alterações do local de fabricação aquelas relacionadas com mudança de endereço da linha completa de fabricação de um medicamento.

Previamente, a empresa deverá notificar a produção de um lote-piloto de acordo com o GUIA PARA NOTIFICAÇÃO DE LOTES PILOTO, exceto quando se tratar de produtos importados.

Será exigida a seguinte documentação:

2.5.1. via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção quando for o caso;

2.5.2. cópia da Autorização de Funcionamento do novo local de fabricação quando cabível;

2.5.3. cópia de Licença de Funcionamento da empresa e/ou Alvará Sanitário atualizado quando cabível;

2.5.4. cópia do Certificado de Responsabilidade Técnica atualizado, emitido pelo Conselho Regional de Farmácia quando cabível;

2.5.5. FPI e FP2 devidamente preenchidos;

2.5.6. justificativa técnica referente a solicitação;

2.5.7. localização da nova instalação;

2.5.8. cópia do dossiê de produção e controle de qualidade de um lote de cada concentração do produto. No caso de fitoterápicos com três ou mais concentrações diferentes e formulações proporcionais, apresentar os dossiês da menor e da maior concentração;

2.5.9. relatório técnico com os resultados e avaliação do teste de estabilidade acelerada referente a um lote da maior e menor concentração, quando aplicável, conforme o GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS;

2.6. Alteração de excipientes

Este item trata de modificação do(s) excipiente(s) da fórmula já registrada.

Será exigida a seguinte documentação:

2.6.1. via original do comprovante de recolhimento da taxa de fiscalização de vigilância sanitária ou de isenção quando for o caso;

2.6.2. FPI e FP2 devidamente preenchidos;

2.6.3. justificativa técnica referente a solicitação;

2.6.4. descrição da fórmula completa, com designação dos componentes conforme a DCB, DCI ou a denominação descrita no Chemical Abstract Substance (CAS), respeitando-se essa ordem de prioridade;

2.6.5. descrição da quantidade de cada substância expressa no sistema numérico decimal ou unidade padrão, com indicação de sua função na fórmula e a respectiva referência de especificação de qualidade descrita na Farmacopeia Brasileira ou, na ausência desta, em outros códigos oficiais autorizados pela legislação vigente;

2.6.6. cópia do dossiê de produção e controle de qualidade de um lote de cada concentração do produto. No caso de fitoterápicos com três ou mais concentrações diferentes e formulações proporcionais, apresentar os dossiês da menor e da maior concentração;

