

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO FITOTERÁPICO CONTENDO  
*Gossypium herbaceum* (Tintura de Algodoeiro Cangeri®) EM RATOS WISTAR

Autor: Rodrigo Nestor Etges

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Ciências Veterinárias na área de  
Farmacologia

Orientador: Dr. João Roberto Braga de  
Mello

Porto Alegre

2007

Rodrigo Nestor Etges

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DO FITOTERÁPICO CONTENDO  
*Gossypium herbaceum* (Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>) EM RATOS WISTAR

Aprovado em 06 de julho de 2007

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Augusto Langeloh

---

Prof. Dra. Fernanda Bastos de Mello

---

Prof. Dr. Geraldo Jotz

## **Dedicatória**

Dedico o presente estudo aos meus amados pais, Jerson Arnaldo e Maria Lizeti e às minhas amadas irmãs, Ana Paula e Ana Cristina Etges. Também dedico esse trabalho ao Prof. Joaquim Fernandez e aos amigos do beta705.

## **Agradecimentos**

Meus agradecimentos ao Laboratório Cangeri pelo custeio e fornecimento de material para elaboração desse estudo e pela oportunidade de avaliar a toxicidade do fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>.

Ao Prof Dr. João Roberto Braga de Mello pela excelente orientação e paciência que teve comigo, desde o tempo em que eu era aluno das disciplinas de Farmacologia Veterinária. Também sou muitíssimo agradecido à imensa ajuda no desenvolvimento dos experimentos e conclusão dos resultados da Dr. Fernanda Mello.

À colega de mestrado Carina Rauber, aos bolsistas Paula, Juliano, Pedro e Lucas.

Ao amigo e colega Prof. André Corrêa, pelo auxílio com os exames histopatológicos.

Aos colegas da Defesa Sanitária Animal da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Agronegócio, pela ajuda que todos têm demonstrado para que eu pudesse concluir esse trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	9
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b> <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1       Aspectos farmacobotânicos sobre o gênero <i>Gossypium herbaceum</i> .....	17
2.2       Aspectos farmacológicos e terapêuticos sobre o gênero <i>G. herbaceum</i> .....	18
2.3       Aspectos toxicológicos do gênero <i>Gossypium herbaceum</i> .....	22
2.4       Intoxicação natural e experimental por <i>Gossypium herbaceum</i> .....	25
<b>3</b> <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1       Medicamento fitoterápico.....	27
3.2       Animais .....	27
3.3       Protocolo Experimental.....	28
3.4       Experimento .....	28
3.5       Análise Estatística .....	30
<b>4</b> <b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b> <b>Toxicidade de doses repetidas do Fitoterápico “Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>”</b> .....	<b>31</b>
4.1.1     Desenvolvimento ponderal dos ratos .....	31
4.1.2     Consumo de ração de ratos durante os 30 dias de tratamento.....	32
4.1.3     Consumo de água de ratos durante os 30 dias de tratamento.....	33
4.2.1     Desenvolvimento ponderal das ratas .....	34
4.2.2     Consumo de ração de ratas durante os 30 dias de tratamento .....	35

4.2.3	Consumo de água de ratas durante os 30 dias de tratamento .....	36
4.3	Massa relativa e histopatologia dos órgãos dos ratos .....	37
4.4	Massa relativa e histopatologia dos órgãos das ratas .....	38
4.5	Avaliação bioquímica sanguínea dos ratos .....	40
4.6	Avaliação hematológica dos ratos .....	41
4.7	Avaliação bioquímica sanguínea das ratas .....	44
4.8	Avaliação hematológica das ratas .....	45
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Massa relativa dos órgãos dos ratos machos tratados durante 30 dias com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2 ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4 ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. São mostrados valores percentuais médios ± epm.....	37
TABELA 2	Massa relativa dos órgãos das ratas tratadas durante 30 dias com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. São mostrados valores percentuais médios ± epm.....	39
TABELA 3	Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratos tratados com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos) ± epm, n = 5 animais por grupo.....	41
TABELA 4	Valores médios (± erro padrão da média) de variáveis sangüíneas em ratos tratados com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 mL.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.....	42
TABELA 5	Valores médios de leucograma (± erro padrão da média) em ratos tratados com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.....	43
TABELA 6	Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratas tratadas com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos) ± epm, n = 5 animais por grupo.....	44

TABELA 7	Valores médios ( $\pm$ erro padrão da média) de variáveis sangüíneas em ratas tratadas com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.....	45
TABELA 8	Valores médios de leucograma ( $\pm$ erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri <sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg <sup>-1</sup> ), G5X (2ml.kg <sup>-1</sup> ), G10X (4ml.kg <sup>-1</sup> ) e um grupo controle GC (4ml.kg <sup>-1</sup> ) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.....	46

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 *Gossypium herbaceum* Linné Disponível em: <http://www.public.iastate.edu/herbarium/gossypium.html>>..... 17
- FIGURA 2 Representação espacial da molécula de gossypol. Disponível em: [http://www.giftpflanzen.com/gossypium\\_herbaceum](http://www.giftpflanzen.com/gossypium_herbaceum)..... 19
- FIGURA 3 Desenvolvimento ponderal de ratos (1º dia = 100%) tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica G10 (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (10ml.kg<sup>-1</sup>.dia) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10)..... 31
- FIGURA 4 Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal dos ratos machos tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (10ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10)..... 32
- FIGURA 5 Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal dos ratos machos tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (10ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10)..... 33
- FIGURA 6 Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (10mL.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10)..... 34

- FIGURA 7 Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal das ratas fêmeas tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (10ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10)..... 35
- FIGURA 8 Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (10ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10)..... 36

## LISTA DE ABREVIATURAS

µm	micrometros
%	por cento
ALT	Alanina-aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANOVA MR	Análise de Variância de Medidas Repetidas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato-aminotranferase
cm	centímetro (s)
COBEA	Colégio Brasileiro de Bioterismo
CHGM	Concentração Hemoglobina Globular Média
CREAL	Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
Epm	erro padrão da média
FA	fosfatase alcalina
g	grama (s)
g/dl	grama por decilitro (s)
GGT	gama-glutamyltransferase
h	hora (s)
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
kg	quilograma
Ltda	Limitada
mEq/l	miliequivalente por litro
mg	miligrama (s)
ml/dl	miligrama por decilitro (s)
ml	mililitros (s)
mm	milímetro (s)
Nº	número
°C	graus Celcius
°GL	graus <i>Gay Lussac</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	probabilidade, nível de significância
q.s.p.	quantidade suficiente para

RE	resolução
SDH	sorbitol desidrogenase
U/l	unidade por litro
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VGM	Volume Globular Médio

## RESUMO

O presente estudo avaliou a segurança de um fitoterápico, constituído de extrato fluído de *Gossypium herbaceum* (algodoeiro) (Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>), através de estudos de toxicidade subcrônica, tendo como base a resolução N<sup>o</sup> 90, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O objetivo era verificar se o presente fitoterápico causava toxicidade sistêmica de doses repetidas em ratos Wistar. Para o teste de toxicidades repetidas constituiu-se quatro grupos de ratos Wistar, cada um composto por 10 machos e dez fêmeas, tratados por via oral (gavagem) com 0,4ml.kg<sup>-1</sup>, 2ml.kg<sup>-1</sup> e 4ml.kg<sup>-1</sup>, respectivamente a dose terapêutica indicada pelo fabricante para seres humanos adultos, 5 vezes e 10 vezes a dose terapêutica, além de um grupo controle, que recebeu o veículo do fitoterápico. Os resultados revelaram que os animais tratados com a dose terapêutica não mostraram alterações sistêmicas que indique toxicidade. As alterações observadas nas variáveis de ganho de massa corporal, dados hematológicos e de bioquímica sanguínea nos grupos tratados com as doses 5 e 10 vezes a dose terapêutica revelaram a ocorrência de toxicidade sistêmica, agravada com a elevação da mesma.

## **ABSTRACT**

The phytoterapic constituted by *Gossypium herbaceum* (cotton plant) (Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>) was investigated from the potential of toxicological effects when orally administered to male and female Wistar rats for 30 days. The studies were based in the resolution n. 90, March 16<sup>th</sup>, 2004 from National Agency of Sanitary Vigilance (ANVISA). The aim of the study was watch if daily doses of the fitoterapic would became in to systemic toxicity. Four experimental groups were formed (10 animals/sex/dose) receiving daily doses of 0.4ml, 2ml and 4ml.kg<sup>-1</sup> respectively the therapeutic dose recommended by the producer for adult humans, 5 times and 10 times the therapeutic dose, besides a control group treated with the phytotherapic vehicle. The results revealed the absence of systemic toxicity with the therapeutic dose. The alterations observed in the weight gain, hematological values and biochemical blood analyses in the doses equivalent to 5 and 10 times the therapeutic doses revealed systemic toxicity, in a dose related manner.

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os medicamentos fitoterápicos são definidos como produtos com fins medicinais que contém derivado ativo obtido das partes aéreas ou subterrâneas de vegetais ou outro material vegetal. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os fitoterápicos ainda são caracterizados pela falta de conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

A utilização de extratos vegetais com fins terapêuticos (fitoterápicos) tem sido crescente, tanto em países desenvolvidos, como em países em desenvolvimento, através de uma intensa ascensão da indústria farmacêutica (SHARAPIN, 1996; CARVALHO, 2005).

Segundo Wojeikowski *et al.*, (2004) este crescente aumento é devido à utilização de uma medicina humana complementar e alternativa, com a falsa idéia de que plantas medicinais ou medicamentos a base de vegetais (fitoterápicos) não possuem toxicidade.

Heinrich & Gibson (2004) citam que pessoas de muitos países pobres utilizam um sistema de medicina tradicional, onde o conhecimento a respeito da maioria das plantas medicinais está baseado no uso popular, sem qualquer investigação a respeito de seus constituintes químicos e efeitos biológicos.

No Brasil, de acordo com a Resolução nº 89, de 16 de março de 2004, foi criada uma Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos (BRASIL, 2004b). Nesta lista podemos encontrar a nomenclatura botânica, o nome popular, a parte utilizada, a padronização, formas de uso, indicações e ações terapêuticas, dose diária, via de administração e restrição de uso. As plantas constantes nesta lista, não necessitam validar as indicações terapêuticas e segurança de uso. As plantas que não constarem nesta lista deverão seguir a Resolução nº 48 (BRASIL, 2004a), na qual os medicamentos fitoterápicos deverão apresentar segurança quanto ao uso, e as indicações terapêuticas deverão ser avaliadas através de uma das três opções:

- 1) Atingir no mínimo 6 pontos, com estudos publicados entre as obras da “lista de Referências Bibliográficas para avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos”, segundo Resolução nº 89 (BRASIL, 2004b).
- 2) Apresentar comprovação de segurança de uso através de testes (toxicologia pré-clínica, toxicologia clínica) e de eficácia terapêutica

(farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica) do medicamento. Os ensaios clínicos deverão atender às exigências estipuladas pelo Conselho Nacional de Saúde, segundo a Resolução nº 90 (BRASIL, 2004c).

- 3) Apresentar um levantamento bibliográfico (etnofarmacológico e de utilização, documentações técnico-científicas ou publicações), que deverá ser avaliado consoante aos seguintes critérios: indicação de uso, coerência com relação às indicações terapêuticas propostas; ausência de risco tóxico ao usuário; ausência de grupos ou substâncias tóxicas, presentes dentro de limites comprovadamente seguros; comprovação de uso seguro por um período igual ou superior a 20 anos.

Caso o medicamento fitoterápico integre a última publicação da Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, nas condições ali definidas, não há necessidade de validar as indicações terapêuticas e a segurança do uso (BRASIL, 2004a).

O fitoterápico “Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>” é indicado para combater a amenorréia, dismenorréia, astenia sexual, impotência sexual e frigidez. Também é indicado contra inflamações e hemorragias menstruais. É considerado um anticoncepcivo masculino e aumenta a produção de leite materno.

O objetivo do presente estudo é verificar se o fitoterápico a base de *Gossypium herbaceum* (Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>) é capaz de desencadear toxicidade sistêmica em ratos Wistar, tratados diariamente pela via oral, por 30 dias com a dose terapêutica recomendada para humanos adultos, com dose cinco vezes maior e 10 vezes maior.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos farmacobotânicos sobre o gênero *Gossypium herbaceum*

O Algodoeiro é uma planta da classe Dicotiledônea, subclasse Dicotiledônia, subclasse Archichlamidae, ordem Malvales, família Malvaceae, gênero *Gossypium spp.* O número de cromossomos é igual a 13. O gênero *Gossypium* atualmente abrange 23 espécies distribuídas pelo mundo. Em estado selvagem, os arbustos do algodoeiro podem atingir 7 metros de altura. As folhas são grandes, com três a sete lobos. É uma espécie trianual ou bianual, nativa da Índia, e hoje cultivada por praticamente todo o globo, sendo utilizada na indústria para obtenção de fibras e óleos. Também é utilizada como fitoterápico, para uma grande variedade de indicações (PINTO, 1976).

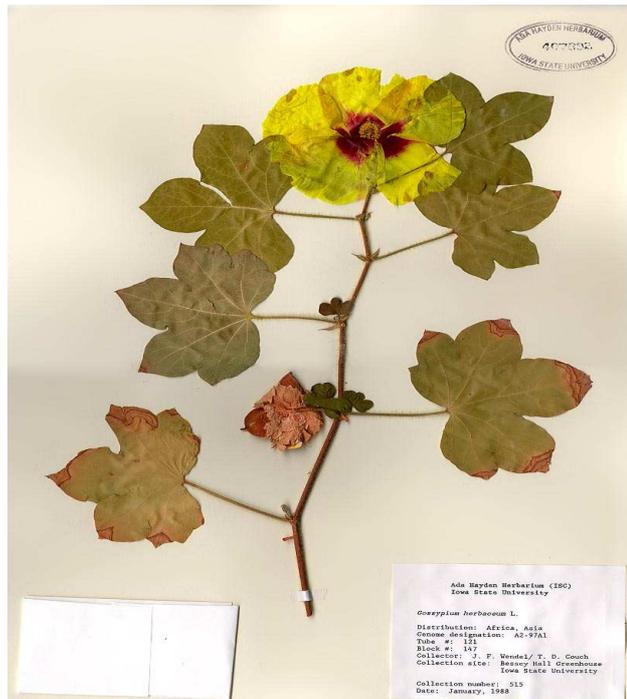


FIGURA 1 *Gossypium herbaceum* Linné

Disponível em:

<http://www.public.iastate.edu/~herbarium/gossypium.html>>

O gossipol ( $C_{30}H_{30}O_8$ ) é um pigmento amarelo de ocorrência natural em plantas da família Malvaceae, encontrado especialmente nas sementes das plantas do gênero *Gossypium* (ABOU-DONIA, 1976). Na nutrição animal, a semente e a torta resultante

da semente do algodão (*G. hirsutum*), após a extração do óleo, representam a segunda fonte de proteína para a alimentação animal, ultrapassado somente pela soja.

Na planta, o gossipol funciona como defesa natural, causando infertilidade nos insetos que se alimentam de sua seiva e sementes, reduzindo assim a proliferação de seu predador.

## **2.2 Aspectos farmacológicos e terapêuticos sobre o gênero *G. herbaceum***

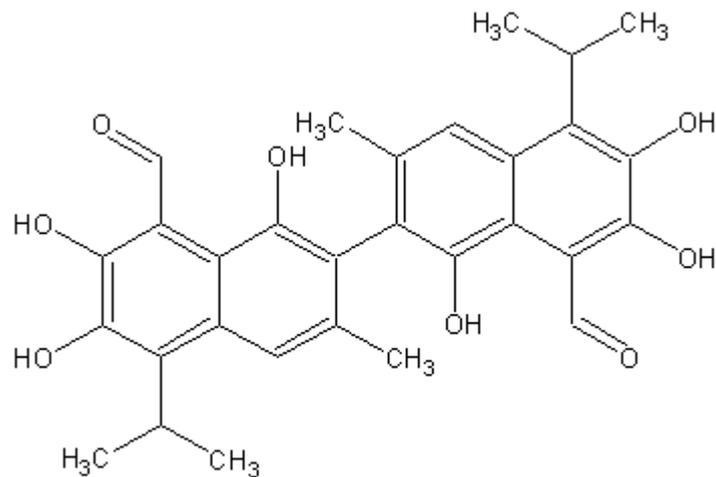
Um dos principais constituintes químicos do extrato do *G. herbaceum* é o gossipol. Ele é extraído das sementes, caule e raiz do algodoeiro. Se ingerido diariamente, provoca infertilidade em muitas espécies animais, inclusive nos homens. Em ratos, a dose que provoca infertilidade em ratos é de 30 mg/kg. Nos homens o gossipol é muito mais eficiente, já que a azospermia é constatada com a dose de 0,3 mg/kg. (LIU, 1987; WEINBAUER *et al.*, 1983 APUD COUTINHO, 2002).

Os efeitos do gossipol sobre a reprodução passaram a ser estudados depois que Liu (1957) *apud* Qian & Wang (1984), descreveu que em determinado vilarejo na China, não houve nascimentos de crianças durante 10 anos, entre a década de 1930 e 1940. Nesse período, por questões econômicas, as pessoas que habitavam o vilarejo passaram a utilizar na alimentação óleo cru de algodão, em substituição ao óleo de soja.

As suas propriedades químicas, físicas e organolépticas são similares com os flavonóides, tais como Quercitin e Gosseptin, potentes antioxidantes. Gossipol é utilizado na indústria como antioxidante (COUTINHO, 2002). O gossipol, por ser um inibidor enzimático inespecífico (HERVE *et al.*, 1996), alterando dessa forma a divisão celular, passou a ser utilizado no tratamento da endometriose (ZHANG *et al.*, 1994) e no controle do câncer, principalmente de mama e genital, apresentando bons resultados (BAND *et al.*, 1989; HU *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2002).

Os estudos chineses demonstraram que o gossipol era eficiente e bem tolerado, não causando alterações na pressão arterial, peso corporal e nos principais parâmetros bioquímicos. A função endócrina permanece inalterada, não havendo perda de libido dos usuários. (WU, 1988).

Weinbauer *et al.*, (1982) identificaram uma clara relação entre a administração de gossipol e inibição da motilidade espermática em ratos. Uma acentuada redução da motilidade foi percebida em animais que receberam diariamente doses superiores a 15 mg/kg por um período de 5 a 10 semanas. Já os animais que receberam doses inferiores a 15 mg/kg não apresentaram redução da motilidade espermática.



Gossypol

FIGURA 2: Representação espacial da molécula de gossypol  
Disponível em: [http://www.giftpflanzen.com/gossypium\\_herbaceum.html](http://www.giftpflanzen.com/gossypium_herbaceum.html)>

Sepehri *et al.*, (1998) investigaram a influência de extratos de plantas com altas concentrações de pectina no aumento da concentração de componentes C3 e C4 do sistema complemento no colostro de mulheres no pós-parto. O sistema complemento é um agente antibacteriano inespecífico que está presente no colostro. Muitos estudos têm demonstrado que extratos de plantas ricos em pectina têm aumentado a liberação de

prolactina e síntese de leite em ratos quando oferecidos via oral. Nesse estudo, extratos de *G. herbaceum* foram dados a mulheres oralmente a partir do segundo dia após o parto. O extrato elevou a concentração de complementos C3 e C4, mas não alterou a atividade complemento hemolítica. Esse estudo sugere que extratos de plantas ricas em pectina favorecem a transferência de complementos C3 e C4 do sangue para o colostro por um mecanismo desconhecido. Os autores sugerem o uso, no pós-parto, de extratos de plantas ricas em pectina para reforçar a atividade antimicrobiana no colostro.

Estudos com animais demonstram que a administração de extrato de várias plantas estimula a síntese de proteínas lácteas através do aumento da liberação de prolactina. Também já foi demonstrado que as moléculas de pectina são capazes de estimular a liberação de prolactina *in vivo* depois de injeções endovenosas. Sepehri *et al.*, (1990) demonstraram num estudo que pectina é capaz de estimular a liberação de prolactina de fragmentos hipofisários incubados em um meio artificial.

Num experimento realizado na Rússia, os pesquisadores Salomov *et al.*, (1994) demonstraram que crianças que ingeriram extratos de plantas que contêm pectina, como o algodoeiro, tiveram benefícios para a saúde. O grupo controle não recebeu o suplemento de pectina. Cápsulas contendo 1g de pectina do algodoeiro eram oferecidas às crianças do grupo experimental a cada 100g de leite ou comida por elas ingeridas, durante 45-60 dias. Verificou-se que o grupo de crianças que ingeriu a pectina diariamente teve como resultado: melhor status nutricional, melhor desenvolvimento físico e um superior sistema eritrocitário (formação de glóbulos vermelhos) quando comparado com as crianças do grupo controle.

WU (1988) especula que um implante interno de liberação lenta de substância análoga ao gossipol possa ser uma solução para diminuir os efeitos tóxicos da substância, assim como cogita sua utilização como espermicida intravaginal. Segundo o

mesmo pesquisador, o gossipol tem efeitos anti-hemorrágicos nos abortos nos primeiros estágios da gestação já estão comprovados. É também uma substância que se mostra eficaz em outros transtornos ginecológicos, como sangramento funcional da menopausa, tumores uterinos e sintomas da endometriose.

Vários estudos com células cancerígenas têm mostrado o gossipol como uma agente que induz a inibição da replicação destas. Band *et al.*, (1989) num estudo *in-vitro* com células cancerosas de tecidos como do ovário e testículos, mostraram que a proliferação dessas células é sensível ao gossipol. O indicador mais sensível da ação do gossipol nesse estudo foi o decréscimo na síntese de DNA devido à inibição da síntese protéica.

Hu *et al.*, (1994) utilizando células de carcinomas mamários humanos e células de tumores esofágicos de ratos para avaliar o potencial antiproliferativo do gossipol contido no leite. O leite com gossipol foi obtido de vacas da raça Pardo Suíço tratadas diariamente com 450 ppm de gossipol. Os resultados mostraram que a proliferação celular foi diminuída de maneira dose dependente. Após realizar experimentos utilizando células de tumores mamários humanos, Gilbert *et al.* (1995) sugeriram que o gossipol e seus análogos possam ter potencial terapêutico contra o câncer de mama, visto que seus testes *in vitro* causaram inibição na proliferação dessas células de maneira dose-dependente.

Extratos de algodoeiro (*Gossypium herbaceum*), assim como outros cinco extratos são utilizados em Trinidad e Tobago como anti-helmínticos para cães (LANS *et al.*, 2000).

### 2.3 Aspectos toxicológicos do gênero *Gossipium herbaceum*

Os efeitos tóxicos do gossipol há muito tempo são conhecidos, principalmente em espécies monogástricas. Esse fato limitou o uso dos subprodutos da produção da lavoura algodoeira na alimentação de aves e suínos (ANDRIGUETO *et al.*, 1982).

Eisele (1986) escreveu que a tolerância do gossipol em monogástricos é variável de acordo com a espécie e, acima de tudo, da idade do indivíduo que faz seu uso, sendo os mais velhos mais tolerantes.

Num estudo com suínos, o pesquisador concluiu que dietas contendo gossipol e possíveis antídotos, com sais contendo na fórmula sais ferrosos como antídoto, podem diminuir seus efeitos, mas a performance reprodutiva nas fêmeas é afetada assim mesmo, reduzindo o tamanho da leitegada.

Terneiros que se alimentam de farinha com altas concentrações de sementes de algodão podem morrer como resultado da toxicidade do gossipol. Nesse trabalho, Holmberg *et al.* (1988) alimentou jovens terneiros com dietas ricas em farinha de sementes de algodão. Graves lesões, incluindo sérias efusões de proteínas de alto peso molecular foram encontradas nas cavidades de vários terneiros, edema de mesentério e hepatomegalia. A lesão histológica mais consistente foi grave necrose centrolobular do tecido hepático. Verificou-se também alta concentração de gossipol no fígado.

Em humanos, um estudo clínico realizado na China com 8806 homens voluntários mostrou que a infertilidade causada pelo gossipol é definitiva. Os voluntários ingeriam diariamente 20mg de gossipol. Quando a dose foi consumida por um período de 75 dias, 98,48% dos voluntários se tornaram inférteis. No caso de doses entre 40 e 50 mg por semana, o efeito contraceptivo manteve-se em 99,07% dos voluntários. No período de 75 dias, sintomas gastrointestinais foram verificados em 4,15% dos voluntários, e fadiga em 12,61% (NATIONAL COLLABORATIVE TEAM

ON THE CLINICAL STUDY OF GOSSYPOL AS MALE ANTIFERTILITY DRUG, 1985).

Um estudo com cabras, East *et al.*, (1994) aponta uma aparente toxicose induzida por gossipol em cabras alimentadas com farinha de semente de algodão. Os sinais clínicos primários foram edema e enrijecimento de membros, edema abdominal, e anorexia. A necropsia revelou edema subcutâneo generalizado, necrose centrolobular aguda no fígado e fibrose miocárdica, consistente com o toxicose por gossipol. Esse estudo indica que cabras são mais susceptíveis aos efeitos do gossipol que bovinos.

Em animais de laboratório, vários estudos de doses repetidas têm demonstrado que o uso contínuo de gossipol reduz o ganho de peso percentual e a ocorrência de mortes durante o tratamento. Saksena *et al.*, (1981) avaliaram em coelhos os efeitos do uso contínuo de diferentes dosagens via oral de gossipol. Os machos eram alimentados diariamente com 80, 40 ou 20 mg/kg e os animais morreram 8-17, 23-35 ou 35-84 dias respectivamente. Todos animais demonstraram perda de apetite e massa corporal, paralisia dos membros, dificuldades respiratórias e prostração enquanto permaneciam nas gaiolas. Na necrópsia, fígado e pulmões estavam congestionados e o estômago e intestinos continham gases. Por outro lado, animais que receberam até 10 mg/dia de gossipol sobreviveram de 77 até 250 dias de tratamento. Os animais que sobreviveram mais tempo apresentaram redução significativa na produção de testosterona, porém por todo período permaneceram férteis.

Corroborando com o estudo supracitado, Heywood (1988) demonstrou perda de ganho de peso em ratos que receberam doses de gossipol de 25 mg/kg/dia. Também ocorreram sinais clínicos envolvendo o trato digestivo, o que pode explicar em parte a perda do ganho de peso corporal dos animais testados. Consistentes mudanças bioquímicas, como redução na concentração de proteínas plasmáticas, cálcio, fósforo

inorgânico e colesterol foram registrados em animais que receberam a partir de 4mg/kg/dia. Não foram percebidas alterações morfológicas.

Weinbauer *et al.*, (1983) trataram ratos com diferentes doses diárias de gossipol (doses baixas: 2,5; 5; 7,5; e doses altas: 15;20 e 30 mg/kg/dia). Os grupos controle (placebo) obtiveram ganho de peso superior aos grupos tratados com diferentes doses do gossipol, sendo que essa perda no ganho de peso foi maior nos grupos considerados como doses altas.

O metabolismo de drogas pelo fígado também é afetado pelo gossipol. Os grupos de ratas fêmeas receberam pela via subcutânea uma dose de 15 mg/kg ou 30mg/kg por cinco dias consecutivos. As fêmeas que receberam a dose de 15mg/kg/dia tiveram os níveis de anilina hidroxilase, citocromo P-450 e da vitamina B5 reduzidos em 73%, 54% e 43% respectivamente, comparado com os grupos controle. Já os animais que receberam a dose de 30mg/kg/dia tiveram os níveis de anilina hidroxilase, citocromo P-450 e da vitamina B5 reduzidos em 60%, 51% e 46% respectivamente quando comparados com os controles. Esses resultados indicam que as alterações hepáticas que ocorrem quando se utiliza gossipol com objetivo de uma ação antifertilidade podem ser responsáveis pelos efeitos tóxicos secundários (JOHASEN & MISRA, 1990).

Outro efeito tóxico do gossipol encontrado na literatura é a hipocalemia. Em 1964 na China ocorreu uma hipocalemia generalizada em grande parte da população sem causa conhecida. Os sintomas eram fraqueza muscular, seguida de paralisia flácida dos membros com níveis de potássio no plasma reduzidos. Após uma pesquisa epidemiológica completa, os investigadores concluíram que a incidência de hipocalemia naqueles distritos estava relacionada com a utilização de óleo de sementes de algodão para de cocção dos alimentos. Porém, as informações disponíveis na literatura científica

ocidental não podem confirmar o gossipol como causa da hipocalcemia. Os pesquisadores desse caso concluem que deve haver uma outra causa além da utilização de gossipol para ter ocorrido essa hipocalcemia (YU & CHANG, 1994)

Segundo Morris (1986) a incidência de efeitos tóxicos no homem que faz o uso do gossipol como contraceptivo é baixa, entretanto fadiga, mudanças na libido, perda de apetite e dores de cabeça tem sido relatadas. A hipocalcemia, o efeito secundário mais ameaçador, ocorre em cerca de 10% dos homens que utilizam o gossipol como contraceptivo.

Qian *et al.*, (1980) relatam casos de hipocalcemia ou até paralisia flácida dos músculos ocasionados por hipocalcemia podem ocorrer durante a utilização de gossipol. A ocorrência de hipocalcemia é muito maior em pacientes tratados com gossipol do que os que não recebem o tratamento, sugerindo que essa substância deva ser a causa dessa hipocalcemia.

#### **2.4 Intoxicação natural e experimental por *Gossypium herbaceum***

Um caso relatado por Hudson *et al.* (1988) demonstra a toxicidade de cascas de semente de algodão. Um rebanho de terneiros que foram alimentados pelo proprietário com esse subproduto da lavoura algodoeira apresentava dispnéia e morte, com pouca sintomatologia. No exame de um dos animais representando o rebanho foi identificada efusão pleural e peritoneal, além de baixa condição corporal. O animal não respondia ao tratamento de suporte. Na necropsia, observou-se falha cardíaca congestiva como causa da morte.

Com caninos, Patton *et al.* (1985) estudaram dois animais do mesmo canil, que foram alimentados diariamente com farinha de sementes de algodão. A toxicose causada pelo gossipol nesses casos causou marcadas anormalidades na contratilidade das fibras

miocárdicas. Apesar da falha cardíaca, um dos animais tinha o coração minimamente dilatado, como ficou revelado numa radiografia torácica. Coagulopatia intravascular disseminada também foi diagnosticada nesse cão.

Outro caso com seis cães intoxicados acidentalmente com sementes de algodão não mostrou nenhuma alteração clínica significativa antes da morte. Na necropsia, apresentaram moderada ascite. O exame histopatológico revelou degeneração miocárdica multifocal e necrose, severo edema pulmonar e congestão passiva crônica dos pulmões, coração, fígado e rins. As sementes de algodão possuem 1.600mg/kg de gossipol livre, uma concentração considerada tóxica para monogástricos (UZAL, 2005)

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Medicamento Fitoterápico

##### a) Fabricante, Amostra e Composição

O medicamento fitoterápico “Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>” utilizado nos experimentos foi fornecido pelo Laboratório Cangeri, sob lote nº 1607008 (fabricado em julho de 2005, com validade de três anos) sendo dispensado o registro no Ministério da Saúde. O responsável técnico do laboratório é o Farmacêutico Marco Antônio Cangeri com registro no Conselho Regional de Farmácia sob o número 5344.

O fitoterápico “Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>” apresenta a seguinte composição:

Extrato fluído de *Gossypium herbaceum*.....(0,2 g)  
Veículo q.s.p.....1 ml

De acordo com o fabricante, o veículo é composto de etanol e água destilada, sendo que a graduação alcoólica do produto depois de pronto é de 40° GL.

A parte da planta utilizada é a raiz. As matérias primas vegetais envolvidas na elaboração do fitoterápico são provenientes da importação do produto. Também é adquirida de produções de diferentes estados do Brasil, principalmente no norte e nordeste, fornecido pelas empresas Santosflora, da cidade de São Paulo-SP e Sanrisil, da mesma cidade e estado.

##### b) Indicações terapêuticas, posologia e contra-indicações

O medicamento fitoterápico “Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>” segundo o fabricante é indicado para combater a amenorréia, dismenorréia, astenia sexual, impotência sexual e frigidez. Também é indicado contra inflamações e hemorragias uterinas. É considerado um anticonceptivo masculino e aumenta a produção de leite materno.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, com idade inicial de 90 dias, provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), com

condições constantes de umidade, temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 7 às 19 horas). Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital Colombo/ PR lote 105) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

**3.3 Protocolo Experimental** (baseado na resolução nº 90, de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA).

### **3.4 Experimento – Determinação da toxicidade oral de doses repetidas**

#### **a) Tratamento e grupos experimentais**

Grupo GDT: 20 ratos, sendo 10 fêmeas e 10 machos, tratados diariamente durante um mês (30 dias), por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo a dose total diária recomendada para seres humanos adultos de 0,4 ml/kg, completada com veículo para proporcionar um volume de 4 ml/kg, como nos demais grupos.

Grupo G5X: 20 ratos, sendo 10 fêmeas e 10 machos, tratados diariamente, durante um mês (30 dias) por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo a dose 5 vezes maior que a dose total diária recomendada para seres humanos adultos de 2 ml/kg, completada com veículo para proporcionar um volume de 4 ml/kg.

Grupo G10X: 20 ratos, sendo 10 fêmeas e 10 machos, tratados diariamente, durante um mês (30 dias) por via oral com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo dose 10 vezes maior que a dose total diária recomendada para seres humanos adultos de 4ml/kg.

Grupo GC (controle): 20 ratos, sendo 10 fêmeas e 10 machos, tratados diariamente, durante um mês (30 dias), por via oral, com auxílio de sonda gástrica flexível, recebendo a dose total diária de 4ml/kg de veículo.

Durante o período experimental, os animais dos 4 grupos foram mantidos individualmente em caixas plásticas (29 cm x 12 cm x 17 cm) com maravalha limpa.

#### **b) Coleta de sangue e eutanásia dos animais**

Todos animais, machos e fêmeas de todos os grupos, após o término dos 30 dias de tratamento foram previamente anestesiados com Zoletil<sup>®</sup> (associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam) pela via intramuscular na dose de 50 mg/kg.

A pele e a parede abdominal foram incisadas, onde se procedeu a coleta de sangue da veia cava caudal para posterior análise. Foram coletadas aleatoriamente

amostras de sangue de 10 animais (5 amostras de machos e 5 amostras de fêmeas) e acondicionadas em tubos com e sem anticoagulante. O volume de sangue coletado foi suficiente para a realização das análises.

Após a coleta de sangue, todos os animais foram eutanasiados por decapitação e então se procedeu a necropsia de todos (naqueles onde houve coleta de sangue e nos que não houve coleta).

Na necropsia todos os órgãos foram observados macroscopicamente. Fígado, rins, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestino, pâncreas, baço, adrenais, tireóide e órgãos sexuais foram retirados de cada um dos animais.

Cada um dos órgãos foi dissecado e pesado individualmente em balança analítica. Estômago e vesícula seminal e intestino foram esvaziados antes da pesagem.

Todos os órgãos retirados dos animais foram acondicionados em solução de formalina tamponada. Os órgãos dos animais de todos os grupos foram enviados para análise histopatológica. Após fixação em formol, foram embebidos em parafina, seccionados em 3  $\mu$ m. Os fragmentos foram montados sobre lâmina, fixados com xilol, corados com hematoxilina/eosina e observados em microscópio óptico com aumentos de 40, 199 e 400 vezes. A análise histopatológica foi realizada no laboratório de Patologia Veterinária, do Departamento de Medicina Animal, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, tendo como responsável o Professor Dr. David Dreimeier.

#### **c) Exames Complementares**

Foram realizados hemograma completo e análise bioquímica de sangue (sódio, potássio, gama-glutamiltanspeptidases, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicérides, glicose, proteínas totais e bilirrubina total). As respectivas análises foram realizadas no Laboratório Veterinário de Análises Clínicas Ltda – Petlab, situado à rua Dr. Oscar Bittecourt, nº 154 Bairro Menino Deus, Porto Alegre, tendo como responsável técnica a Médica Veterinária Márcia Regina Oliveira Cordeiro.

Para a análise bioquímica sangüínea foram utilizados kits para dosagens bioquímicas que utilizam metodologia cinética e colorimétrica da marca Labtest. A leitura dos resultados foi realizado utilizando o aparelho espectrofotométrico SB 190 da marca Selm.

#### **d) Variáveis avaliadas**

Em todos os grupos tratados com o fitoterápico, assim como no grupo controle, avaliou-se a massa corporal diária (g), consumo diário de ração (g), consumo diário de água (ml), análise macroscópica dos órgãos, peso relativo (%) das vísceras no dia do sacrifício (fígado, baço, rins, pulmão, coração, esôfago, estômago, intestino, pâncreas, adrenais, tireóide e órgãos sexuais), assim como foi avaliado o aparecimento de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso progressiva e diminuição da ingestão de água e ração.

Exames complementares como análise histopatológica dos órgãos, hemograma completo e análise bioquímica sanguínea foram realizados em todos os grupos.

### **3.4 Análise Estatística**

Os dados estatísticos foram avaliados estatisticamente utilizando o teste de análise de variância (ANOVA), análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de MR) e teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa SPSS para Windows 11.0 e EXCEL. As variáveis quantitativas como desenvolvimento ponderal dos animais de cada grupo, consumos de água e de ração foram comparados através de análise de medidas repetidas.

As variáveis quantitativas como análise bioquímica, massa relativa dos órgãos de machos e de fêmeas foram comparadas através da análise de variância de uma via (ANOVA). Quando necessário efetuou-se pós-teste de Bonferroni para identificação dos grupos estatisticamente diferentes (CALLEGARI-JAQUES, 2004; RIOLA, 2003).

As diferenças foram consideradas significativas sempre que  $p < 0,05$ , com nível de confiança de 95%

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Toxicidade de doses repetidas do fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri®

#### 4.1.1 Desenvolvimento ponderal de ratos durante os 30 dias de tratamento

A Figura 3 mostra o ganho relativo de massa corporal (1° dia = 100%) durante os 30 dias de tratamento, calculado a partir da mensuração diária de massa corporal (g) dos ratos tratados diariamente, por via oral com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo GDT, Tintura Algodoeiro Cangeri® na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica G5X ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre GC e GDT com relação a G5X e G10X, a partir do décimo segundo dia de tratamento. Houve óbito um animal no G10X no 14° dia e no 28° dia de tratamento. Todos animais após o tratamento diário apresentavam desorientação locomotora.

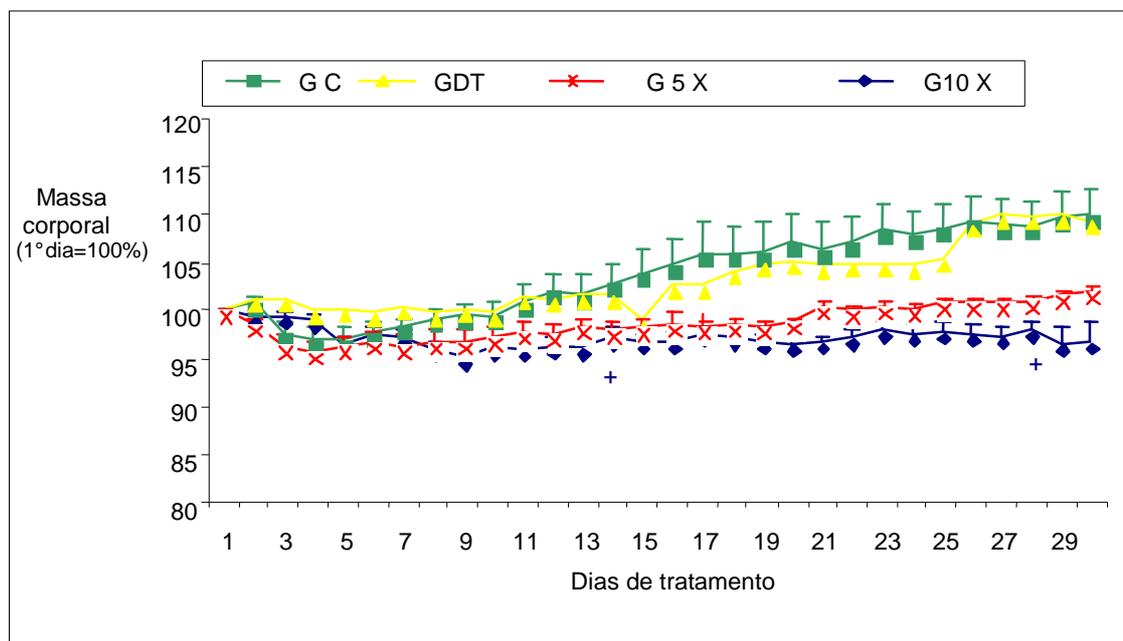


FIGURA 3. Desenvolvimento ponderal de ratos (1° dia = 100%) tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo com dose dez vezes a dose terapêutica G10 ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ .dia) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

+ óbito (14° e 28° dia de tratamento)

#### 4.1.2 Consumo de ração de ratos durante os 30 dias de tratamento

A Figura 4 mostra o consumo de ração (g) em relação a massa corporal (%), avaliado durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionando a massa corporal diária (g) dos ratos machos tratados por via oral com o fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes GDT ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), G5X ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), G10X ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. No 25º dia de tratamento, houve um erro na aferição do consumo do GDT. Verificou-se que houve oscilações no consumo de ração nos diferentes grupos, sem significância estatística.

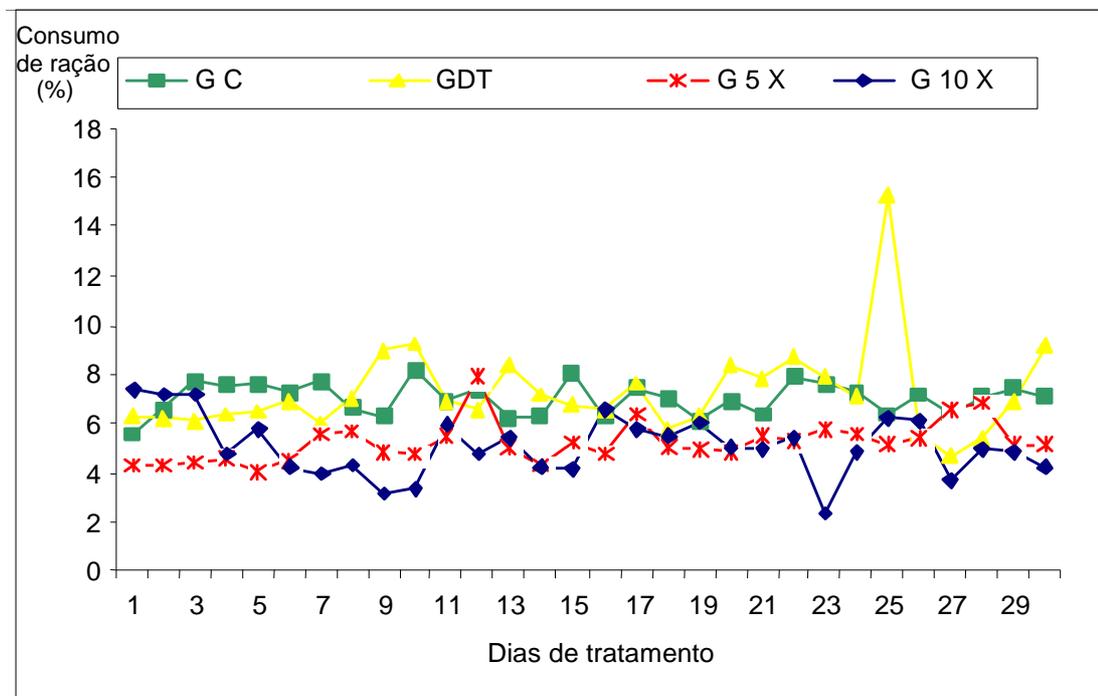


FIGURA 4. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal dos ratos machos tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica G5X ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

#### 4.1.3 Consumo de água de ratos machos durante os 30 dias de tratamento contínuo

A Figura 5 mostra o consumo de água (ml) em relação a massa corporal (%), avaliado durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionando a massa corporal diária (g) dos ratos machos tratados por via oral com o fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes GDT ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), G5X ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), G10X ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. No 19º dia de tratamento, houve vazamento das garrafas de água, atrapalhando a aferição do real consumo do grupo controle. Verificou-se que houve oscilações no consumo de água nos diferentes grupos, sem significância estatística.

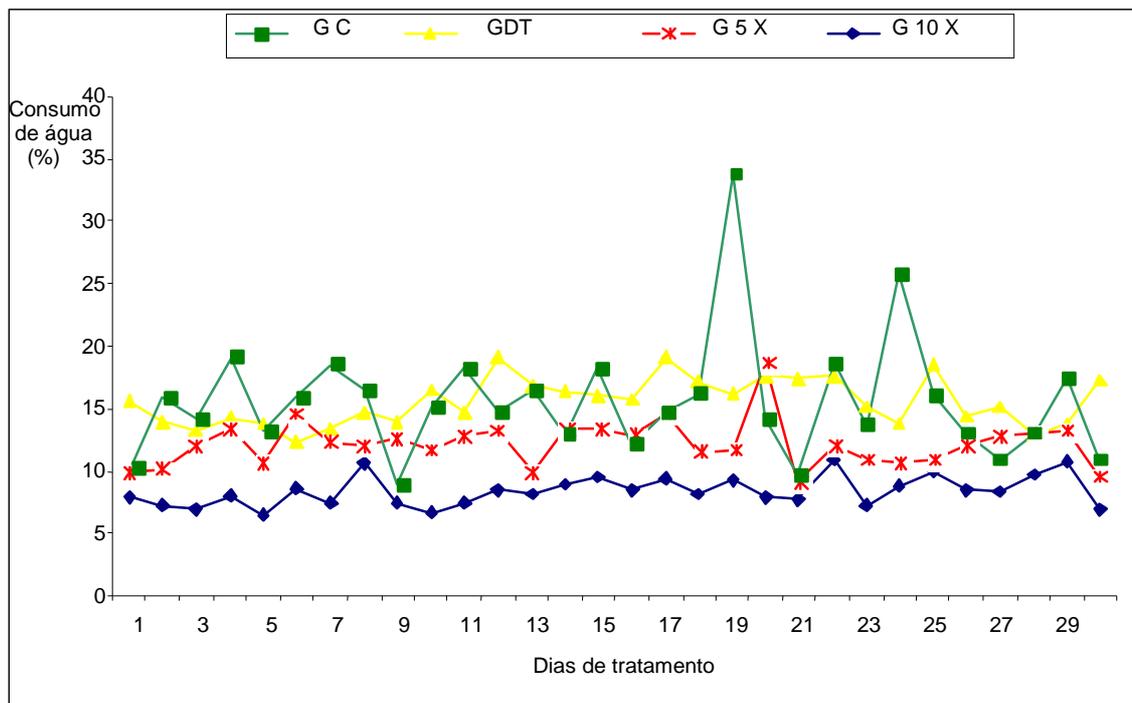


FIGURA 5. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal dos ratos machos tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

#### 4.2.1 Desenvolvimento ponderal de ratas durante os 30 dias de tratamento

A Figura 6 mostra o ganho relativo de massa corporal (1º dia = 100%) durante os 30 dias de tratamento, calculado a partir da mensuração diária de massa corporal (g) das ratas tratadas diariamente, por via oral com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4 \text{ ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica ( $2 \text{ ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4 \text{ ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4 \text{ ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre CG e GDT com relação a G5X e G10X, a partir do oitavo dia de tratamento. Houve um óbito do G5X no dia 9 do tratamento e cinco óbitos no grupo G10X, nos dias 10, 13, 14, 16 e 17 de tratamento. Após o tratamento, todo grupo apresentava dificuldade locomotora.

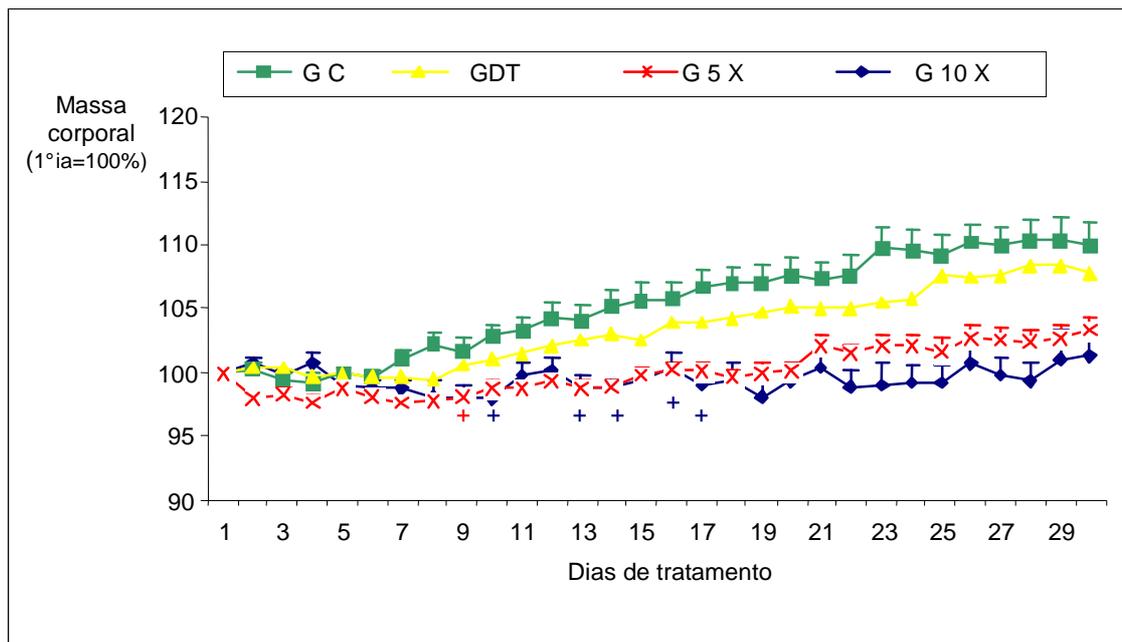


FIGURA 6. Desenvolvimento ponderal de ratas (1º dia = 100%) tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri® com três doses diferentes: Grupo na dose terapêutica GDT ( $0,4 \text{ ml.kg}^{-1}$ ), Grupo com dose cinco vezes a dose terapêutica G5X ( $2 \text{ ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4 \text{ ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4 \text{ ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

+ óbitos

#### 4.2.2 Consumo de ração de ratas durante os 30 dias de tratamento

A Figura 7 mostra o consumo de ração (g) de ratas em relação a massa corporal (%), avaliado durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionando a massa corporal diária (g) das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que houve oscilações no consumo de ração nos diferentes grupos, sem significância estatística.

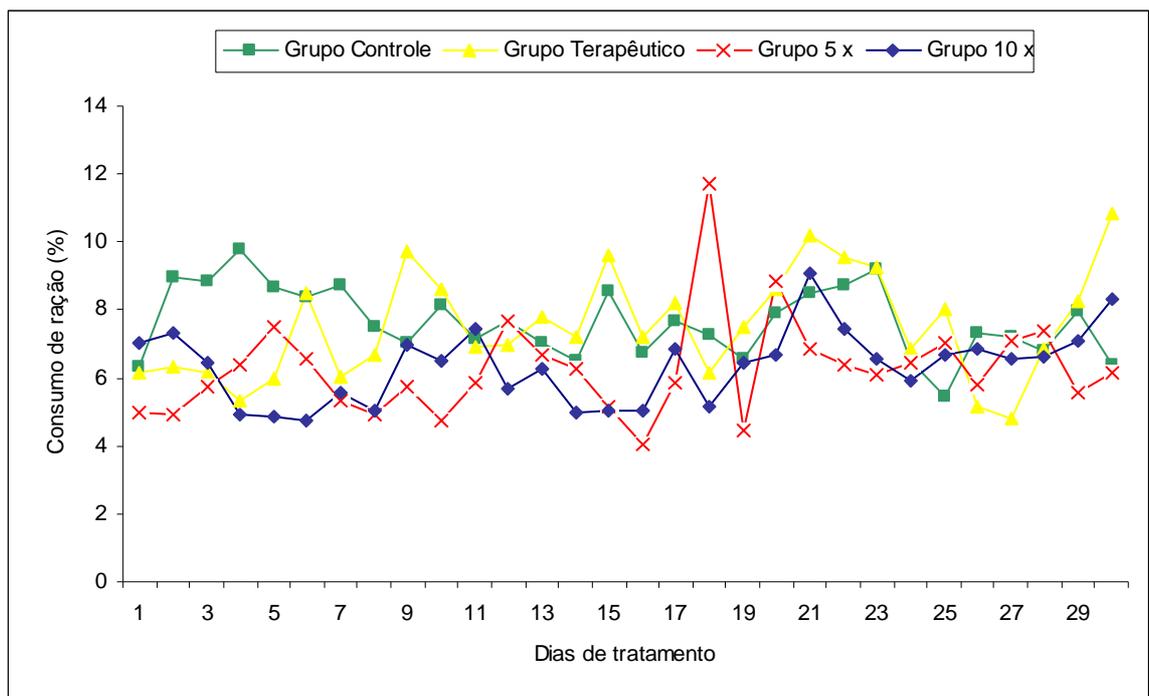


FIGURA 7. Consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal das ratas fêmeas tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

### 4.2.3 Consumo de água de ratas durante os 30 dias de tratamento

A Figura 8 mostra o consumo de água (ml) em relação a massa corporal (%), avaliado durante os 30 dias do tratamento. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de água (ml), relacionando a massa corporal diária (g) das ratas tratadas por via oral com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes superior a dose terapêutica ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que houve oscilações no consumo de água nos diferentes grupos, sem significância estatística.

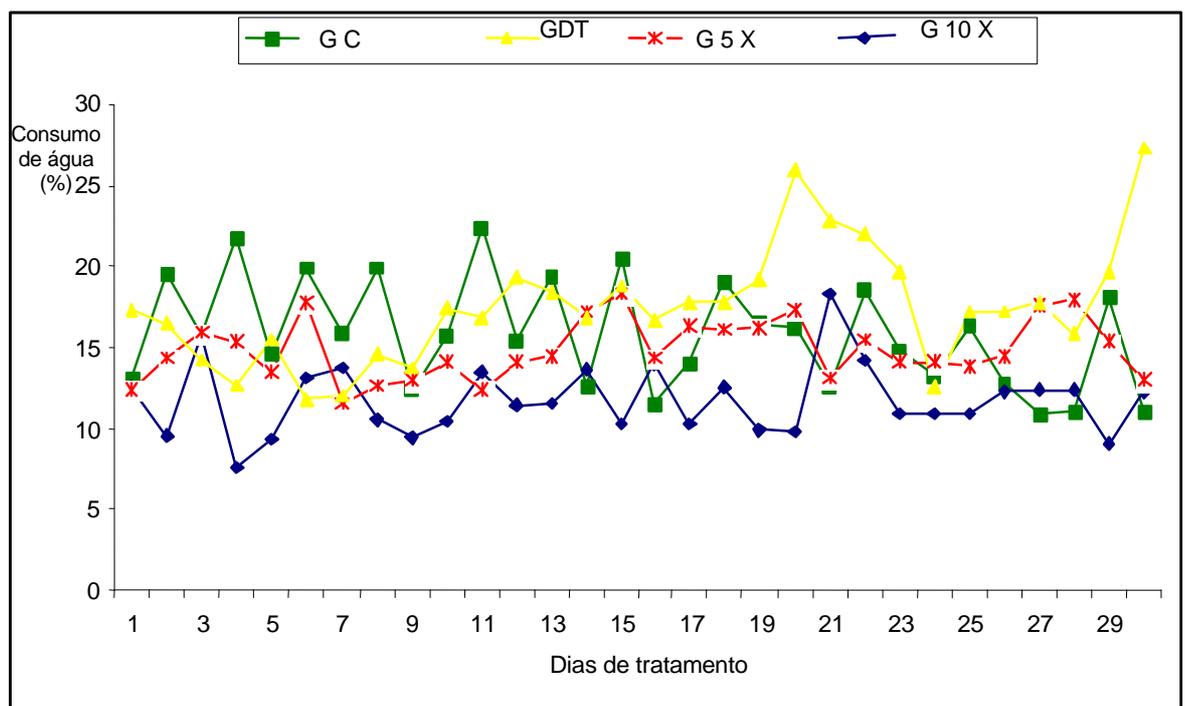


FIGURA 8. Consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal das ratas tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo GDT na dose terapêutica ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G5X com dose cinco vezes a dose terapêutica ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo G10X com dose dez vezes a dose terapêutica ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Os valores representam a média relativa dos animais por grupo (n=10).

### 4.3 Massa relativa e histopatologia dos órgãos dos ratos

O fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> alterou de forma significativa a massa relativa dos órgãos (%) dos ratos tratados com três diferentes doses diferentes GDT (0,4ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) em comparação com o grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico (Tabela 1). A análise de variância de uma via (ANOVA) para todos os animais tratados por grupo foi respectivamente: tireóide esquerda (p= 0,96), tireóide direita (p= 0,23) , esôfago (p < 0,01\*\*), estômago (p < 0,01\*\*), pâncreas (p < 0,01\*\*), fígado (p= 0,054), intestinos (p = 0,17), coração (p= 0,16), pulmões (p = 0,06), baço (p < 0,01\*\*), rim esquerdo (p= 0,018\*), rim direito (p= 0,027\*), adrenal esquerda (p < 0,01\*\*), adrenal direita (p= 0,45), testículo esquerdo (p < 0,01\*\*), testículo direito (p < 0,01\*\*), vesícula seminal (p= 0,022\*), próstata (p < 0,01\*\*).

TABELA 1: Massa relativa dos órgãos dos ratos machos tratados durante 30 dias com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2 ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. São mostrados valores percentuais médios ± epm.

Massa relativa dos órgãos (%)	GC (n=10)	GDT (n=10)	G5X (n=10)	G10X (n=8)
Tireóide esquerda	0,005±0,001	0,005±0,001	0,005±0,0005	0,005±0,002
Tireóide direita	0,006±0,001	0,006±0,001	0,004±0,003	0,004±0,002
Esôfago	0,046±0,004 <sup>a</sup>	0,044±0,005 <sup>a</sup>	0,030±0,003 <sup>a</sup>	0,076±0,005 <sup>b</sup>
Estômago	0,997±0,164 <sup>a</sup>	0,803±0,038 <sup>a</sup>	0,633±0,009 <sup>b</sup>	0,542±0,030 <sup>b</sup>
Pâncreas	0,120±0,016 <sup>a</sup>	0,084±0,005 <sup>b</sup>	0,164±0,023 <sup>a</sup>	0,145±0,010 <sup>a</sup>
Fígado	4,048±0,218	3,963±0,180	4,118±0,135	3,450±0,102
Intestinos	8,198±0,553	8,116±0,403	7,545±0,154	7,074±0,252
Coração	0,325±0,009	0,335±0,018	0,305±0,009	0,301±0,009
Pulmões	0,540±0,015	0,613±0,034	0,538±0,023	0,517±0,026
Baço	0,281±0,010 <sup>a</sup>	0,322±0,018 <sup>a</sup>	0,271±0,014 <sup>a</sup>	0,168±0,010 <sup>b</sup>
Rim Esquerdo	0,386±0,018 <sup>a</sup>	0,349±0,012 <sup>ab</sup>	0,333±0,012 <sup>ab</sup>	0,321±0,011 <sup>b</sup>
Rim Direito	0,393±0,014 <sup>a</sup>	0,380±0,010 <sup>a</sup>	0,355±0,011 <sup>ab</sup>	0,313±0,026 <sup>b</sup>
Adrenal Esquerda	0,014±0,001 <sup>a</sup>	0,015±0,001 <sup>a</sup>	0,009±0,001 <sup>b</sup>	0,016±0,001 <sup>a</sup>
Adrenal Direita	0,012±0,001	0,013±0,001	0,012±0,001	0,015±0,001
Testículo esquerdo	0,890±0,049 <sup>a</sup>	0,871±0,043 <sup>a</sup>	0,503±0,018 <sup>b</sup>	0,507±0,018 <sup>b</sup>
Testículo direito	0,863±0,042 <sup>a</sup>	0,899±0,059 <sup>a</sup>	0,490±0,015 <sup>b</sup>	0,497±0,017 <sup>b</sup>
Vesícula Seminal	0,267±0,030 <sup>a</sup>	0,190±0,012 <sup>b</sup>	0,257±0,019 <sup>a</sup>	0,202±0,010 <sup>ab</sup>
Próstata	0,195±0,027 <sup>a</sup>	0,293±0,027 <sup>b</sup>	0,226±0,014 <sup>ab</sup>	0,105±0,014 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05)

Com relação aos exames anátomo-patológicos dos ratos, foram observados casos de congestão hepática em grau variável, vacuolização de hepatócitos, congestão renal e pneumonia intersticial de grau variável nos diferentes grupos experimentais. Houve óbito de 2 ratos do grupo G10X durante o período de tratamento. Após o tratamento, todo grupo apresentava dificuldade locomotora.

#### **4.4 Massa relativa e histopatologia dos órgãos das ratas**

O fitoterápico Tintura de Algodoeiro<sup>®</sup> alterou de forma significativa a massa relativa dos órgãos (%) das ratas tratadas com três diferentes doses diferentes GDT (0,4ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) em comparação com o grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico (Tabela 2). A análise de variância de uma via (ANOVA) para todos os animais tratados por grupo foi respectivamente: tireóide esquerda (p= 0,06), tireóide direita (p= 0,06) , esôfago (p = 0,19), estômago (p < 0,79), pâncreas (p < 0,01\*\*), fígado (p < 0,01\*\*), intestinos (p < 0,01\*\*), coração (p= 0,29), pulmões (p = 0,74), baço (p < 0,01\*\*), rim esquerdo (p= 0,33), rim direito (p= 0,77), adrenal esquerda (p = 0,055), adrenal direita (p= 0,06), ovário esquerdo (p = 0,42), ovário direito (p = 0,08), útero (p= 0,14).

TABELA 2: Massa relativa dos órgãos das ratas tratadas durante 30 dias com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. São mostrados valores percentuais médios  $\pm$  epm.

Massa relativa dos órgãos (%)	GC (n=10)	GDT (n=10)	G5X (n=9)	G10X (n=4)
Tireóide Esquerda	0,005 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,0004	0,004 $\pm$ 0,0005	0,007 $\pm$ 0,0003
Tireóide Direita	0,005 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,003	0,004 $\pm$ 0,000	0,007 $\pm$ 0,000
Esôfago	0,072 $\pm$ 0,012	0,077 $\pm$ 0,003	0,071 $\pm$ 0,016	0,116 $\pm$ 0,012
Estômago	0,885 $\pm$ 0,078	0,847 $\pm$ 0,043	0,885 $\pm$ 0,063	0,781 $\pm$ 0,053
Pâncreas	0,171 $\pm$ 0,025 <sup>a</sup>	0,149 $\pm$ 0,010 <sup>a</sup>	0,121 $\pm$ 0,030 <sup>a</sup>	0,318 $\pm$ 0,040 <sup>b</sup>
Fígado	4,570 $\pm$ 0,192 <sup>a</sup>	3,719 $\pm$ 0,103 <sup>b</sup>	3,992 $\pm$ 0,133 <sup>b</sup>	3,783 $\pm$ 0,151 <sup>b</sup>
Intestinos	9,660 $\pm$ 0,444 <sup>a</sup>	8,855 $\pm$ 0,219 <sup>b</sup>	8,534 $\pm$ 0,218 <sup>b</sup>	8,064 $\pm$ 0,288 <sup>b</sup>
Coração	0,398 $\pm$ 0,038	0,343 $\pm$ 0,011	0,339 $\pm$ 0,017	0,342 $\pm$ 0,009
Pulmões	0,889 $\pm$ 0,265	0,680 $\pm$ 0,028	0,739 $\pm$ 0,035	0,657 $\pm$ 0,026
Baço	0,314 $\pm$ 0,015 <sup>a</sup>	0,326 $\pm$ 0,023 <sup>a</sup>	0,313 $\pm$ 0,011 <sup>a</sup>	0,224 $\pm$ 0,012 <sup>b</sup>
Rim Esquerdo	0,400 $\pm$ 0,020	0,357 $\pm$ 0,021	0,362 $\pm$ 0,011	0,363 $\pm$ 0,283
Rim Direito	0,402 $\pm$ 0,018	0,399 $\pm$ 0,022	0,387 $\pm$ 0,014	0,371 $\pm$ 0,014
Adrenal Esquerda	0,032 $\pm$ 0,006	0,022 $\pm$ 0,007	0,019 $\pm$ 0,002	0,032 $\pm$ 0,004
Adrenal Direita	0,029 $\pm$ 0,004	0,023 $\pm$ 0,001	0,019 $\pm$ 0,002	0,033 $\pm$ 0,001
Ovário Esquerdo	0,051 $\pm$ 0,007	0,055 $\pm$ 0,024	0,023 $\pm$ 0,004	0,034 $\pm$ 0,001
Ovário Direito	0,053 $\pm$ 0,014	0,025 $\pm$ 0,001	0,025 $\pm$ 0,004	0,036 $\pm$ 0,001
Útero	0,328 $\pm$ 0,033	0,289 $\pm$ 0,020	0,218 $\pm$ 0,036	0,275 $\pm$ 0,026

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05)

Com relação aos exames anátomo-patológicos das ratas, foram observados casos de congestão hepática em grau variável, vacuolização de hepatócitos, congestão renal e pneumonia intersticial de grau variável nos diferentes grupos experimentais. Houve óbito de 1 rata do grupo G5X e 6 óbitos de ratas do grupo G10X durante o período de tratamento.

#### 4.5 Avaliação bioquímica sanguínea dos ratos

A Tabela 3 mostra a média dos valores bioquímicos sanguíneos absolutos dos ratos tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo 2 com dose cinco vezes superior a dose terapêutica (G5X) ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. A análise de variância (ANOVA) para todos os animais tratados por grupo foi respectivamente: ácido úrico ( $p = 0,74$ ), ALT ( $p < 0,01^{**}$ ), AST ( $p = 0,054$ ), bilirrubina total ( $p < 0,01^{**}$ ), creatinina ( $p < 0,01^{**}$ ), proteínas totais ( $p < 0,01^{**}$ ), triglicérides ( $p = 0,018^*$ ), colesterol total ( $p < 0,01^{**}$ ), fosfatase alcalina ( $p = 0,06$ ), glicose ( $p = 0,04^*$ ), potássio ( $p = 0,33$ ), sódio ( $p < 0,01^{**}$ ), uréia ( $p < 0,01^{**}$ ), GGT ( $p = 0,23$ ).

TABELA 3: Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratos tratados com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos) ± epm, n = 5 animais por grupo.

Variáveis	GC	GDT	G5X	G10X
Ácido. Úrico (mg/dl)	2,16±0,52	2,62±0,58	2,68±0,49	2,08±0,24
ALT (U/l)	45,56±5,50 <sup>a</sup>	52,28±2,61 <sup>a</sup>	68,42±6,45 <sup>a</sup>	132,5±28,19 <sup>b</sup>
AST (U/l)	92,92±9,88	133,24±5,40	180,3±10,4	253,02±76,12
Bilirrubina.total (mg/dl)	0,172±0,02 <sup>a</sup>	0,375±0,03 <sup>b</sup>	0,124±0,01 <sup>a</sup>	0,262±0,05 <sup>b</sup>
Creatinina (mg/dl)	0,536±0,03 <sup>a</sup>	0,596±0,03 <sup>a</sup>	0,750±0,03 <sup>b</sup>	0,912±0,05 <sup>c</sup>
Proteínas. totais (g/dl)	5,972±0,11 <sup>ab</sup>	5,704±0,16 <sup>a</sup>	6,076±0,11 <sup>b</sup>	6,58±0,25 <sup>c</sup>
Triglicerídeos (mg/dl)	87,2±10,49 <sup>a</sup>	107,8±16,18 <sup>a</sup>	68,2±8,74 <sup>b</sup>	145,0±22,71 <sup>c</sup>
Colesterol total (mg/dl)	56,8±3,95 <sup>a</sup>	55,8±4,77 <sup>a</sup>	51,8±3,85 <sup>a</sup>	77,0±4,98 <sup>b</sup>
FA (U/l)	152,6±13,07	144,6±20,89	166,8±22,86	161,6±10,85
Glicose (mg/dl)	140,4±15,77 <sup>a</sup>	102,6±10,64 <sup>b</sup>	140,4±8,51 <sup>a</sup>	143,8±4,31 <sup>a</sup>
Potássio (mEq/l)	5,36±0,57	5,18±0,38	6,74±1,09	6,24±0,37
Sódio (mEq/l)	143,0±1,55 <sup>a</sup>	154,6±1,54 <sup>b</sup>	142,6±1,57 <sup>a</sup>	138,8±0,37 <sup>c</sup>
Uréia (mg/dl)	50,87±0,55 <sup>a</sup>	43,76±1,53 <sup>a</sup>	50,75±1,99 <sup>a</sup>	38,37±1,16 <sup>b</sup>
GGT (U/l)	2,6±0,51	2,0±0,45	1,2±0,2	4,0±1,76

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas (p < 0,05)

#### 4.6 Avaliação hematológica dos ratos

A Tabela 4 mostra o quadro hematológico dos ratos tratados com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo1 na dose terapêutica (GDT) (0,4ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes superior a dose terapêutica (G5X) (2ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que, exceto CHGH, todas as demais variáveis diferiram entre os grupos.

TABELA 4: Valores médios ( $\pm$  erro padrão da média) de variáveis sanguíneas em ratos tratados com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), G5X ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), G10X ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.

Variável	GC	GDT	G5X	G10X
Eritrócitos (milhões/mm <sup>3</sup> )	8,236 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	6,246 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	7,685 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	7,376 $\pm$ 0,29 <sup>c</sup>
Hemoglobina (g/%)	15,47 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	13,46 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	15,47 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	15,47 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	45,0 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	40,6 $\pm$ 1,56 <sup>bc</sup>	38,75 $\pm$ 1,11 <sup>c</sup>	42,2 $\pm$ 1,71 <sup>ab</sup>
VGM	54,69 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	65,02 $\pm$ 1,42 <sup>c</sup>	50,56 $\pm$ 1,95 <sup>a</sup>	57,25 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>
CHGM	34,35 $\pm$ 0,56	33,23 $\pm$ 0,67	35,06 $\pm$ 0,36	34,42 $\pm$ 0,77

Valores de p calculados: eritrócitos ( $p < 0,01^{**}$ ), hemoglobina ( $p < 0,045^{*}$ ), hematócrito ( $p = 0,042^{*}$ ), VGM ( $p < 0,01^{**}$ ), CHGM ( $p = 0,6$ )

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

Contagem global de leucócitos e percentual de eosinófilos mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nas demais variáveis estudadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 5).

TABELA 5: Valores médios de leucograma ( $\pm$  erro padrão da média) em ratos tratados com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.

Variáveis	GC	GDT	G5X	G10X
Leucócitos/mm <sup>3</sup>	8540 $\pm$ 574,1 <sup>a</sup>	4260 $\pm$ 294,2 <sup>b</sup>	6025 $\pm$ 759,8 <sup>c</sup>	5220 $\pm$ 587,7 <sup>bc</sup>
Neutrófilos bastonados (%)	0	0	0	0
Neutrófilos segmentados (%)	22,6 $\pm$ 2,6	37,0 $\pm$ 4,9	22,6 $\pm$ 5,92	22,6 $\pm$ 4,83
Eosinófilos (%)	1,4 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	0,5 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>
Basófilos (%)	0,4 $\pm$ 0,24	0,2 $\pm$ 0,2	0,25 $\pm$ 0,25	0
Linfócitos (%)	71 $\pm$ 2,77	59,8 $\pm$ 4,24	61,75 $\pm$ 0,65	68,2 $\pm$ 5,28
Monócitos (%)	4,6 $\pm$ 1,12	2,4 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,65	3,0 $\pm$ 0,61

Valores de p calculados: leucócitos (p < 0,01\*\*), neutrófilos segmentados (p = 0,09), eosinófilos (p = 0,045\*), basófilos (p = 0,54), linfócitos (p = 0,27), monócitos (p = 0,12).

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativas (p < 0,05)

#### 4.7 Avaliação bioquímica sangüínea das ratas

A Tabela 6 mostra a média dos valores bioquímicos sanguíneos absolutos das ratas tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 2 com dose cinco vezes superior a dose terapêutica (G5X) (2 ml.kg<sup>-1</sup>), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) (4 ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa das variáveis analisadas entre os grupos.

TABELA 6: Níveis séricos da atividade do ácido úrico, ALT, AST, bilirrubina, creatinina, proteínas totais, triglicerídeos, colesterol total, FA, glicose, potássio, sódio, uréia e GGT em ratas tratadas com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4 ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. Dados expressos pela média absoluta (valores bioquímicos) ± epm, n = 5 animais por grupo.

Variáveis	GC	GDT	G5X	G10X
Ácido úrico (mg/dl)	2,1±0,32	1,48±0,4	2,14±0,44	#
ALT (U/l)	47,02±4,4	54,78±6,60	61,6±17,5	36,95±6,09
AST (U/l)	90,94±6,15	166,36±22,49	287,7±116,5	71,85±22,9
Bilirrubina total (mg/dl)	0,27±0,04	0,28±0,04	0,102±0,01	0,24±0,02
Creatinina (mg/dl)	0,722±0,05	0,652±0,03	0,752±0,05	0,512±0,03
Proteínas totais (g/dl)	5,778±0,24	5,874±0,18	7,146±0,29	5,725±0,19
Triglicerídeos (mg/dl)	51,4±3,85	74,0±17,51	49,0±15,33	44,0±17,16
Colesterol total (mg/dl)	51,4±3,37	56,0±1,34	53,8±5,09	51,5±2,25
FA (U/l)	138,4±23,3	80,8±12,56	117,4±30,15	38,0±10,78
Glicose (mg/dl)	175±4,15	105±6,02	112,2±5,75	160,5±8,11
Potássio (mEq/l)	6,52±0,56	4,06±0,40	6,28±0,97	5,02±1,18
Sódio (mEq/l)	142,4±0,40	155,4±1,33	143,6±0,98	139,0±1,15
Uréia (mg/dl)	52,28±1,73	40,28±2,91	51,39±5,50	26,48±2,72
GGT (U/l)	1,4±0,40	2,6±0,40	2,6±0,93	3,0±0,71

# Valor não determinado

#### 4.8 Avaliação hematológica das ratas

A Tabela 7 mostra o quadro hematológico das ratas tratadas com o fitoterápico Tintura Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três doses diferentes: Grupo 1 na dose terapêutica (GDT) ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo 2 com dose cinco vezes superior a dose terapêutica (G5X) ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), Grupo 3 com dose dez vezes a dose terapêutica (G10X) ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. Verificou-se que, exceto CHGM, todas as demais variáveis diferiram entre os grupos.

TABELA 7: Valores médios ( $\pm$  erro padrão da média) de variáveis sanguíneas em ratas tratadas com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT ( $0,4\text{ml.kg}^{-1}$ ), G5X ( $2\text{ml.kg}^{-1}$ ), G10X ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) e um grupo controle GC ( $4\text{ml.kg}^{-1}$ ) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.

Variável	GC	GDT	G5X	G10X
Eritrócitos (milhões/ $\text{mm}^3$ )	$7,738\pm 0,17^a$	$5,460\pm 0,89^c$	$6,992\pm 0,12^b$	$6,557\pm 0,12^b$
Hemoglobina (g%)	$14,25\pm 0,48^a$	$12,24\pm 0,22^b$	$12,22\pm 0,43^b$	$13,57\pm 0,32^{ab}$
Hematócrito (%)	$42,8\pm 0,73^a$	$37,8\pm 0,73^b$	$35,6\pm 0,75^b$	$40,25\pm 0,85^a$
VGM	$55,38\pm 1,18^a$	$69,32\pm 1,93^b$	$50,91\pm 0,48^a$	$61,40\pm 1,18^b$
CHGM	$33,27\pm 0,74$	$32,38\pm 0,29$	$34,28\pm 0,56$	$33,72\pm 0,38$

Valores de p calculados: eritrócitos ( $p < 0,01^{**}$ ), hemoglobina ( $p < 0,03^*$ ), hematócrito ( $p < 0,01^{**}$ ), VGM ( $p < 0,01^{**}$ ), CHGM ( $p = 0,11$ )

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ )

A contagem global de leucócitos mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de ratas de GC e G5X em comparação com GDT e G10X. Diferenças significativas também foram observadas na variável percentual de linfócitos. (Tabela 8). Nas demais variáveis estudadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 8: Valores médios de leucograma ( $\pm$  erro padrão da média) em ratas tratadas com fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> com três diferentes doses GDT (0,4ml.kg<sup>-1</sup>), G5X (2ml.kg<sup>-1</sup>), G10X (4ml.kg<sup>-1</sup>) e um grupo controle GC (4ml.kg<sup>-1</sup>) tratado com veículo do fitoterápico. N = 5 animais por grupo.

Variáveis	GC	GDT	G5X	G10X
Contagem global de leucócitos (mm <sup>3</sup> )	7800 $\pm$ 1280,6 <sup>a</sup>	3580 $\pm$ 482,07 <sup>b</sup>	5100 $\pm$ 741,62 <sup>a</sup>	4125 $\pm$ 278,01 <sup>b</sup>
Neutrófilos bastonados (%)	0	0	0	0
Neutrófilos segmentados (%)	25,4 $\pm$ 3,04	35,6 $\pm$ 4,64	40,4 $\pm$ 4,30	26,7 $\pm$ 4,75
Eosinófilos (%)	1,2 $\pm$ 0,58	0,8 $\pm$ 0,37	2,8 $\pm$ 1,50	1,25 $\pm$ 0,25
Basófilos (%)	0,4 $\pm$ 0,24	0,2 $\pm$ 0,2	0	0
Linfócitos (%)	71,0 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>	62,8 $\pm$ 4,53 <sup>bc</sup>	56,0 $\pm$ 2,90 <sup>c</sup>	70,5 $\pm$ 4,87 <sup>a</sup>
Monócitos (%)	2,0 $\pm$ 0,71	0,8 $\pm$ 0,37	0,8 $\pm$ 0,37	1,5 $\pm$ 1,19

Valores de p calculados: leucócitos (p < 0,01\*\*), neutrófilos segmentados (p = 0,06), eosinófilos (p = 0,39), basófilos (p = 0,306), linfócitos (p < 0,039\*), monócitos (p = 0,52). Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatisticamente significativas (p < 0,05)

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra que a administração diária do fitoterápico Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>, por um período de 30 dias nas doses de 2ml e 4ml.kg<sup>-1</sup> desencadeou toxicidade sistêmica em ratos e ratas.

O desenvolvimento ponderal dos machos e das fêmeas foi inferior nos grupos que receberam doses diárias de 2ml.kg<sup>-1</sup> (G5X) e 4ml.kg<sup>-1</sup> (G10X) quando comparados com machos e fêmeas tratadas com o veículo do fitoterápico (GC) e com a dose terapêutica de 0.4ml.kg<sup>-1</sup> (GDT), sendo a diferença significativa a partir do décimo segundo dia nos machos e do oitavo dia de tratamento nas fêmeas. A diminuição do ganho de massa corporal foi maior de acordo com o aumento da dose do fitoterápico tanto nos machos quanto nas fêmeas. Essa redução do ganho de massa corporal em relação ao grupo controle pode ser percebida inclusive nos animais tratados com a dose terapêutica, tanto nos machos e nas fêmeas. No final do tratamento dos machos houve um equilíbrio entre o ganho de massa corporal do GC e GDT. Esse padrão de desenvolvimento ponderal pode, indicar uma intoxicação sistêmica dose dependente. Esses dados vão de encontro com os resultados obtidos por WEINBAUER *et al.*, (1983), que trataram ratos com diferentes doses diárias de gossipol. Os resultados desse estudo demonstraram que quanto maior a dose da substância, menor era o ganho de massa corporal dos animais.

Entre os machos, os animais dos grupos G5X e G10X não apresentaram ganho de massa corporal como os grupos GC e GDT, sendo que o grupo G10X findou o tratamento com média de massa corporal inferior ao primeiro dia de tratamento. Nos machos do grupo G10X foram observados dois óbitos no decorrer do tratamento, sendo um no décimo terceiro dia e outro no vigésimo sétimo dia. Já nas fêmeas houve 6 óbitos no grupo G10X, ocorridos respectivamente no oitavo, nono, décimo segundo, décimo terceiro, décimo quinto e décimo sexto dia de tratamento. As fêmeas dos grupos GC e GDT tiveram aumento de massa corporal após trinta dias de tratamento, já os grupos G5X e G10XT chegaram no trigésimo dia de tratamento com a massa corporal próximo ao primeiro dia de tratamento.

No presente trabalho, podemos perceber que apesar dos machos terem apresentado maiores alterações bioquímicas, hematológicas e leucocitárias, as fêmeas tiveram maior número de óbitos, indicando que as fêmeas são mais susceptíveis ao fitoterápico que os machos. Wu *et al.*, (1981), realizaram uma pesquisa procurando o efeito da utilização contínua de gossipol sobre a função endócrina e a fertilidade de

hamsters. Ao analisar os resultados perceberam que, como as fêmeas haviam apresentado menor aumento ponderal de massa corpórea, elas devem ser mais susceptíveis que os machos aos efeitos do gossipol.

Houve alteração significativa da massa de órgãos dos grupos GDT, G5X e G10X, tanto em machos quanto em fêmeas quando comparados ao grupo controle. Juntamente com as alterações do desenvolvimento ponderal citados anteriormente, podemos concluir que os efeitos tóxicos ocorridos podem ser explicados, pelo menos em parte, pela presença do gossipol na planta *Gossypium herbaceum*. Conforme Abou-Donia (1976), o gossipol é um pigmento amarelo de ocorrência natural em plantas da família Malvaceae, especialmente nas sementes das plantas do gênero *Gossypium sp.* Segundo Coutinho (2000), o gossipol é um polifenol isolado das sementes, caule e raiz da planta do algodoeiro (*Gossypium herbaceum*). A substância pura, na forma cristalina, pode ser extraída com álcool aquecido.

Esse efeito sobre o desenvolvimento ponderal pode ser explicado parcialmente pelo consumo muito errático de água e ração, tanto em machos quanto em fêmeas. O consumo de ração e água dos machos dos grupos G5X e G10X foi inferior aos grupos GC e GDT, com muita variação diária dentro dos grupos, mas não houve diferença estatística. Nas fêmeas ocorreu variação semelhante, também sem significância estatística. Essa flutuação no consumo pode resultar em alterações na forma de converter alimento e conseqüentemente influenciar o desenvolvimento ponderal dos animais durante o tratamento.

Heywood (1988), também constatou que animais tratados com gossipol tiveram redução do ganho de massa corporal durante o tratamento. Além desses resultados, encontrou também redução na concentração plasmática de proteínas totais, cálcio, fósforo inorgânico e colesterol dos animais tratados com doses de gossipol acima de  $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . No presente estudo, os machos tratados com o fitoterápico tiveram variações na concentração sérica das proteínas totais. Os animais do GDT tiveram uma redução na concentração de proteínas séricas totais, já os grupos G5X e G10X tiveram um aumento na concentração em relação ao GC, sendo diferenças com significância estatística. A concentração sérica de colesterol nos machos não apresentou variação significativa nos grupos GDT e G5X em relação ao GC. Já o G10X teve elevação de 35% na concentração plasmática de colesterol quando comparado ao GC. Já nas fêmeas tratadas, os níveis plasmáticos de proteínas totais e colesterol tiveram variações diferentes aos machos. O grupo tratado que apresentou maior elevação da concentração

de proteínas séricas foi o G5X, voltando aos níveis do grupo controle no G10X. Quanto ao colesterol, o GDT foi que apresentou maior concentração sérica, voltando aos níveis do grupo controle nos grupos G5X e G10X. Não ocorreu diferença significativa nessas duas variáveis.

Silva *et al.*, (2002) testaram a toxicidade do gossipol na gestação e lactação de ratas (*Rattus rattus spp.*). Observaram que houve menor de ganho de massa corporal das ratas tratadas com gossipol e que quanto maior foi a dose recebida, maior foi a redução do ganho. Concluíram também que fêmeas gestantes são mais sensíveis aos efeitos do gossipol que os machos.

Trabalhos anteriores, como o publicado por SAKENSA *et al.*, (1981), que testou os efeitos do gossipol em coelhos, já havia demonstrado que o uso contínuo dessa substância causa redução do desenvolvimento ponderal dos animais e na necropsia foi percebida congestão nos pulmões e fígado. Em nossos estudos, alterações do tipo congestão hepática e pulmonar foram observadas em todos os grupos experimentais, inclusive no grupo controle. Haschek *et al.*, (1989) realizaram um estudo de caso em que suínos inadvertidamente foram tratados com farinha de semente de algodão. A histopatologia desses animais mostrou congestão centrolobular, perda de hepatócitos e degeneração gordurosa.

No presente estudo, as alterações hepáticas puderam ser comprovadas também através do aumento das concentrações séricas das enzimas hepáticas ALT e AST. Nos machos, o aumento da concentração dessas duas enzimas no plasma sangüíneo dos animais foi gradual de acordo com o aumento das doses, ou seja, quanto maior a dose do fitoterápico, maior a concentração das referidas enzimas hepáticas. Já nas fêmeas, o aumento também ocorreu nas duas enzimas hepáticas avaliadas, porém no grupo G10X os níveis ficaram abaixo do GC. A enzima GGT teve seus níveis séricos elevados nas fêmeas de acordo com o aumento da dose de fitoterápico, porém não houve diferença significativa. Já nos machos, o padrão foi diferente. Os grupos GDT e G5X tiveram as concentrações de GGT reduzidas em relação ao grupo controle, enquanto que o grupo G10X teve os níveis médios elevados em 53% em relação ao grupo controle. Esses resultados demonstram que, apesar das fêmeas tratadas terem maior número de óbitos durante os 30 dias de tratamento, os machos apresentaram maiores alterações bioquímicas, principalmente das enzimas hepáticas ALT e AST (KANEKO, 1997).

Segundo Mello *et al.*, (2002a), a toxicidade sistêmica é manifestada através de alterações de desenvolvimento ponderal dos animais, redução dos consumos de água e

ração, alterações comportamentais como prostração, apatia e presença de pêlos arrepiados. Harkness & Wagner (1993), citam que a perda de peso é um sintoma não específico de doença, e que a superpopulação e a competição pelo alimento, má oclusão, megaeosôfago e nefrose estão entre as possíveis causas de perda de peso em ratos.

No Laboratório de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, onde esse experimento foi realizado, vários fitoterápicos já foram submetidos a estudos pré-clínicos. Castro *et al.*, (2004) num experimento em que ratos e ratas, divididos em grupos da mesma forma que o presente estudo, foram tratados com *Gingko biloba* por 30 dias. Os animais não tiveram o desenvolvimento ponderal alterado, não foram observadas alterações morfológicas e as massas relativas dos órgãos internos não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle. Jacobus *et al.* (2006), testaram da mesma forma por trinta dias ratos e ratas com o fitoterápico contendo *Roripa nasturtium* Rusby, *Musa* sp., *Ficus carica* Linné, *Tagetes minua* Linné e mel (Xarope de Agrião Composto Cibecol<sup>®</sup>). Os resultados mostraram que não houve toxicidade sistêmica, pois comparando o grupo controle com os tratados percebeu-se a inexistência de diferença significativa no desenvolvimento ponderal, na massa relativa dos órgãos, nos exames histopatológicos, hematológicos e bioquímicos entre os grupos tratados e o grupo controle.

Um estudo pré-clínico com o composto fitoterápico contendo *Passiflora alata* (maracujá), *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adornis vernalis*, não ocasionou toxicidade quando administrados diariamente por 44 dias para ratas Wistar, incluindo gestação e lactação, ratos Wistar e em coelhos Nova Zelândia. A dose utilizada foi 10 vezes maior que a dose terapêutica preconizada para fins terapêuticos em humanos (MELLO *et al.*, 2007a). Testando a toxicidade de um fitoterápico composto de *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculun*, *Sambucus australis* e *Cassia angustifólia*, Mello *et al.*, (2007b), concluiu que o produto administrado diariamente, com a dose 10 vezes maior que a preconizada para humanos por 44 dias, não causou toxicidade sistêmica. Os animais testados foram ratas Wistas, incluindo período de gestação e lactação, ratos Wistar e coelhos Nova Zelândia.

A formulação fitoterápica contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus* e *Pipadenia colubrina* (Cassau Copmposto<sup>®</sup>), testado com doses repetidas por trinta dias em grupos com doses equivalentes ao presente estudo, também não apresentou diferenças significativas comparando os grupos tratados com o grupo controle (RAUBER, 2006). Todos

trabalhos citados anteriormente, realizados no mesmo laboratório, avaliando as reações dos fitoterápicos em ratos e coelhos, não mostraram sinais de toxicidade sistêmica quando os animais tratados, com diferentes doses de fitoterápicos, tiveram suas variáveis comparadas com a do grupo controle. Isso provavelmente ocorre em virtude das concentrações variáveis de princípios ativos nas diferentes formulações fitoterápicas testadas. Em nossos estudos, a maior concentração de substâncias potencialmente capazes de causar efeitos adversos e/ou tóxicos seja a causa da toxicidade da formulação Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>

A massa relativa dos órgãos foi significativamente alterada com as três diferentes doses (GDT, G5X e G10X) do fitoterápico Tintura de Algodoeiro em relação ao grupo controle, tratado como veículo do fitoterápico, tanto nos machos quanto nas fêmeas. Nas fêmeas houve diferença significativa entre as massas relativas dos fígados dos animais tratados com as três diferentes doses do fitoterápico (GDT, G5X e G10XT) quando comparadas com a massa do GC, tratadas com veículo do fitoterápico.

Nos machos e nas fêmeas, os rins (direito e esquerdo) foram os órgãos que tiveram uma redução na massa progressiva de acordo com a dose utilizada. Esse efeito sobre o parênquima renal é reforçado pelos dados obtidos pela concentração plasmáticas de creatinina, que indica lesão renal (González & Silva, 2003). Os machos, assim como nas demais pesquisas bioquímicas do plasma, tiveram uma elevação das concentrações de acordo com o aumento das doses do fitoterápico, sendo a diferença significativa. Já nas fêmeas essa variação das concentrações de creatinina não se repetiu, sendo que no grupo G10X a concentração foi inferior àquela encontrada no grupo controle, sem diferença significativa.

Muitos trabalhos disponíveis na literatura sobre a utilização de extratos de vegetais por homens de áreas da Ásia, principalmente na China, que na sua composição possuem gossipol, como no caso da pesquisa realizada por Qian *et al.*, (1980) relatam que um dos efeitos dessa substância é a hipocalemia. No presente estudo os machos tratados com a Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup> tiveram uma elevação dos níveis séricos de potássio, comparados com o grupo controle, (exceto o grupo GDT, que teve pequena queda). Já nas fêmeas, houve uma redução na concentração plasmática de potássio no GDT. O grupo G5X teve os valores novamente aproximando-se dos do GC e o G10X tendo nova queda. Esses dados mostram que essa hipocalemia encontrada em trabalhos anteriores não pode ser confirmada. As diferenças não tiveram significância estatística tanto nos machos quanto nas fêmeas.

Da planta *Gossypium herbaceum*, as duas principais substâncias extraídas são as pectinas e o gossypol (WU, 1988). Vários estudos, como o de Salomov *et al.*, (1994) demonstraram a efetividade da utilização de extratos de plantas como o algodoeiro no desenvolvimento físico e melhora no status nutricional de crianças que utilizaram o extrato de algodoeiro, quando comparadas às do grupo controle.

O efeito que fez com que as substâncias extraídas do *Gossypium herbaceum*, e de plantas da família Malvaceae, fossem estudadas é a infertilidade. Logo este efeito foi atribuído ao gossipol. Na planta, o gossipol tem uma função de defesa natural, pois causa infertilidade nos insetos predadores, que se alimentam de sua leiva ou sementes, causando infertilidade (PINTO, 1976).

O gossypol, extraído de plantas do gênero *Gossypium spp.*, é considerado um inibidor enzimático inespecífico (HERVE *et al.*, 1996). Por esse motivo, passou a ser usado na China para tratamento de endometriose (Zhang *et al.*, 1994) e controle de câncer, principalmente os de mama e genital (BAND *et al.*, 1989; HU *et al.*, 1994; LIU *et al.*, 2002).

Avaliando o quadro hematológico houve, tanto em machos quanto fêmeas, uma redução do hematócrito dos grupos tratados com o fitoterápico quando comparados com o grupo controle. De acordo com Lopes *et al.*, (1996); Raskin (1998) e Feldman (2000) o hematócrito é um dos mais úteis exames laboratoriais para se registrar a ocorrência de anemia, pois através dele informações como volume globular e coloração do plasma podem ser obtidas.

Na contagem de eritrócitos, houve um padrão de alterações iguais em fêmeas e em machos. Em relação ao GC, todos grupos tratados tiveram contagem de eritrócitos inferior, sendo a maior redução tanto em machos quanto em fêmeas ocorrendo no GDT. Na determinação de hemoglobina, os machos apresentaram uma redução apenas no grupo GDT, voltando aos valores do grupo controle nas demais doses. Já as fêmeas tiveram redução no valor de hemoglobina dos grupos GDT e G5X, tendendo aos valores do GC no grupo G10X. Reynolds & Tone (1988), investigaram a capacidade do gossipol em quelar o ferro com a administração oral diária por 16 semanas de gossipol em ratos machos. Findo o período de tratamento, foram injetadas uma solução intraperitoneal de ferro marcado radioativamente e uma porção de ferro livre. A quantidade de ferro foi mensurada nos eritrócitos circulantes, medula óssea, fígado, baço, músculo esquelético e urina nos períodos de 6, 12 ou 24 horas após a aplicação do ferro marcado radioativamente. Concluíram que a incorporação de ferro foi aumentada

no baço, fígado, medula óssea e sangue dos animais tratados com gossipol, e aumentava de acordo com o aumento do período pós-aplicação de ferro intraperitoneal. Os parâmetros hematológicos continuaram dentro dos padrões de normalidade durante o tratamento, sugerindo uma compensação eritropoiética nos ratos tratados.

De acordo com Lopes *et al.*, (1996) o leucograma é a parte do hemograma que pesquisa alterações quantitativas e/ou morfológicas das séries leucocitárias. Suas alterações quantitativas representam a leucocitose (aumento) e a leucopenia (diminuição). Os autores citam que a leucocitose pode ocorrer devido a causas fisiológicas como exercício extremo, parto/gestação, excitação e patológicas, devido a algum efeito mórbido (infecções bacterianas, necrose tecidual). A leucopenia está relacionada a doenças virais e severas infecções bacterianas. No presente estudo, os machos tratados dos grupos GDT, G5X e G10X apresentaram uma redução significativa na contagem de leucócitos totais quando comparados ao grupo controle, sendo que a maior queda na contagem dessas células ocorreu no grupo GDT. A contagem de eosinófilos nos machos também sofreu redução significativa nos grupos GDT e G5X em relação ao grupo controle, elevando-se novamente ao valor controle no grupo G10X. Nas fêmeas também houve redução significativa da contagem de leucócitos totais nos grupos GDT e G5X quando comparados ao GC. Nas fêmeas do grupo G10X houve redução, mas sem significância estatística.

Segundo Mezey (1985), os efeitos metabólicos do álcool são devidos à sua ação direta ou de seus metabólitos. O etanol pode causar hiperglicemia ou hipoglicemia dependendo da reserva de glicogênio estar ou não adequada, inibição de síntese protéica e elevação das concentrações séricas de triglicerídeos. Thurman *et al.*, (1999), relatam que tratamentos com etanol resultam na liberação de endotoxinas de bactérias intestinais e aumentam a permeabilidade das membranas celulares a essas endotoxinas. Ainda, segundo os autores, fêmeas são mais susceptíveis a esses efeitos que os machos. Como no presente trabalho todos grupos receberam etanol, junto com o fitoterápico nos casos dos grupos GDT, G5X e G10X, e no veículo no grupo GC, podemos sugerir que, parte dos efeitos adversos observados com a formulação fitoterápica testada pode ser atribuído à presença de álcool. De fato, algumas alterações observadas, aconteceram também no grupo controle, que recebeu somente o veículo.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que os efeitos adversos (redução de massa corporal, ocorrência de óbitos e lesões histológicas), que estão ligados à toxicidade sistêmica, não foram observados com as doses terapêuticas (GDT)

e cinco vezes a dose terapêutica (G5X). Tendo em vista os resultados obtidos, que demonstram o aparecimento de efeitos adversos a partir da dose 5X, é recomendável que a utilização de preparações contendo em sua composição *Gossypium herbaceum* em veículo alcoólico tenha estabelecimento de dose realizado com acuidade, não sendo indicado o uso por períodos prolongados.

Com base nos resultados obtidos, observa-se que o fitoterápico a base de *Gossypium herbaceum* (Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>) nas doses cinco e dez vezes maior que a dose terapêutica preconizada para humanos, é capaz de desencadear toxicidade sistêmica, segundo o conceito preconizado por Osweiler (1998) para xenobióticos. Segundo o mesmo autor, os valores de concentração para classificar as substâncias como desde relativamente não prejudicial (de 15g ou mais de substância por quilograma de massa corporal) até extremamente tóxico (1mg/kg ou menos). Assim podemos classificar a “Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>”, na concentração da dose terapêutica (200mg/ml, sendo a dose terapêutica preconizada para humanos adultos de 0,4ml/kg, ou seja 80mg/kg), como moderadamente tóxico, quase no limite de ser considerado levemente tóxico.

## 6 CONCLUSÕES

A dose terapêutica da preparação fitoterápica contendo extrato fluído de *Gossypium herbaceum*, (Tintura de Algodoeiro Cangeri<sup>®</sup>) não desencadeou a ocorrência de sinais de toxicidade, quando administrada por via oral, durante 30 dias a ratos e ratas Wistar.

As doses equivalentes a 5 e 10 vezes a dose terapêutica causaram redução de forma dose-dependente do desenvolvimento de massa corporal, durante os 30 dias de tratamento.

As fêmeas foram mais afetadas que os machos com relação aos efeitos sobre a massa corporal e aos óbitos durante o período de tratamento.

As alterações hematológicas e da bioquímica sanguínea foram mais freqüentes nos machos

As alterações observadas com as doses equivalentes a 5 e 10 vezes a dose terapêutica configuram toxicidade sistêmica para a formulação fitoterápica para essas doses.

Os resultados obtidos indicam que a utilização de preparação fitoterápica contendo em sua composição *Gossypium herbaceum* em um veículo alcoólico deve ser realizada mediante controle acurado da dose, não sendo recomendado o uso prolongado.

## REFERÊNCIAS

ANDRIGUETO, J. M.; PERLY, L.; MINADI, I. GEMAEL, <sup>a</sup>; FLEMING, J.S.; SOUZA, G.A.; BONA, A. **Nutrição Animal**. Curitiba, Nobel, 1982, p. 105.

ABOU-DONIA, M. B. Physiological effects and metabolism of gossypol. **Residue Reviews**, v. 61, p. 125-160, 1976.

BAND, V. HOFFER, A. P.; BAND, H; RHINEHARDT, A. E.; KNAPP, R. C.; MATLIN, S. A.; ANDERSON, D. J. Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive cancer cell lines. **Gynecology and Oncology**. v. 32, p. 273-277, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. AVISA. RE nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil; Brasília, D.F.**, 18 mar. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. AVISA. RE nº 89 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Lista de registros simplificado de registros de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil; Brasília, D.F.**, 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. AVISA. RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil; Brasília, D.F.**, 18 mar. 2004c.

CALLEGARI-JAQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 255 p.

CARVALHO, J. C. T. **Formulário Médico – Farmacêutico de Fitoterapia**. Belo Horizonte: Ciência Brasiliis, p. 2-9, 2005.

CASTRO, A. P.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica do Ginkgo biloba sobre a fertilidade e reprodução de ratos Wistar. **Dissertação de Mestrado**. PPGCV, UFRGS, 2004.

COUTINHO, E. M. Gossypol: a contraceptive for men. **Contraception**. v. 65, p. 259-263, 2002.

COUTINHO, E. M.; ATHAYDE, C.; ATTA, G. Gossypol blood levels and inhibition of spermatogenesis in men taking gossypol as a contraceptive. **Contraception**. v. 61, p. 61-67, 2000.

EAST, N. E.; ANDERSON, M.; LOWENSTINE, L. J. Apparent gossypol-induced toxicosis in adult dairy goats. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v. 204, p. 642-643, feb. 1994.

EISELE, G. R. A perspective on gossypol ingestión in swine. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 28, p. 118-122, 1986.

FELDMAN, B. F. **Veterinary Hematology**. 5<sup>a</sup> ed. New York: Lippincott Willians e Willians, 2000, 1344 p.

GILBERT, N. E.; O'REILLY, J. E.; CHANG, C. J.; LIN, Y. C.; BRUGGEMEIER, R. W. Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells. **Life Science**. v. 57, p. 61-67, 1995.

GONZÁLES, F. H. D.; SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003, p. 179-198.

HARKNESS, J. E. WAGNER, J. E. **Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 1993. 238p.

HASCHEK, W. M.; BEASLEY, V. R.; BUCK, W. B.; FINNELL, J. H. Cottonseed meal (gossypol) toxicosis in a swine herd. **Journal of American Veterinarian Association**. v. 195, p. 613-615, 1989.

HEINRICH, M.; GIBSON, A. Fundamentals of Phermacognosy and Phytoterapy. **Elsevier Science**, p. 287-289, 2004.

HERVE, J. C.; *et al.* Contraceptive gossypol communication n human and rat cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 313, p. 243-255, 1996.

HEYWOOD, R. The toxicology of gossypol acetic acid and gossypol. **Contraception**. v. 37, p. 185-190, 1988.

HOLMBERG, C. A. et al. Pathological and toxicological studies of calves fed high concentration cotton seed meal diet. **Veterinary Pathology**. v. 25, p. 147-153, 1988.

HU, Y. F.; CHANF, C. J.; BRUEGGEMEIER, R. W.; LIN, Y. C. Presence of antitumor activities in the milk collected from gossypol-treated dairy cows. **Cancer Letters**. v. 87, p. 17-23, 1994.

HUDSON, L. M.; KERR, L. A.; MASLIN, W. R. Gossypol toxicosis in a herd of beef calves. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v. 192, p. 1303-1305, 1988.

JACOBUS, D.; MELLO, F. B.; J. R. B. MELLO. Avaliação da toxicidade oral aguda e em doses repetidas de fitoterápico contendo *Roripa bastyrrium* Rusby, *Musa spp.*, *Fícus*

*carica* Linné, *Tagetes minuta* Linné e mel (Xarope de Agrião composto Cibecol<sup>®</sup>) em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, p. 295-300, 2006.

JOHANSEN, R. L.; MISRA, H. P. Effects of gossypol on the hepatic drug metabolizing system in rats. **Contraception**. v. 42, p. 683-690, 1990.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego, Academic Press, 1997, p. 289.

LANS, C. HARPER, T. GEORGES, K. BRIDGEWATER, E. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**. V. 45, p. 201-220, 2000.

LOPES, S. T. A. et al. Patologia Clínica Veterinária. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, 1996. 166p.

LIU, S.; KULP, S. K.; SUGIMOTO, Y.; JIANG, J.; CHANG, H. L.; DOWD, M. K.; WAN, P. The (-)-enantiomer of gossypol possesses higher anticancer potency than racemic gossypol in human breast cancer. **Anticancer Residence**. v. 22, p. 33-38, 2002.

MELLO, F. B.; LANGELOH, A.; MELLO, J. R.B. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungo*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, p. 190-199, 2007.a

MELLO, F. B.; LANGELOH, A.; MELLO, J. R.B. Estudo de toxicidade pé-clínica de fitoterápico contendo *Pimpinella anisum*, *Foeniculum foeniculum*, *Sambucus australis* e *Cássia angustifólia*. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, p. 229-236, 2007.b

MEZEY, E. Metabolic effects of alcohol. **Fed Procedure**. v. 44, p. 134-138, 1985.

MORRIS, I. D. Gossypol: a male contraceptive with potential? **Journal of Medicine Sciences**. v. 14, p. 1077-1080, 1986.

NATIONAL COLLABORATIVE TEAM ON THE CLINICAL STUDY OF GOSSYPOL AS MALE ANTIFERTILITY DRUG. The clinical study of gossypol in 8806 men. **Shengzhi yu Biyun**. v. 5, p. 5-11, 1985.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998. 17 p.

PATTON, C. S. et al. Heart failure caused by gossypol poisoning in two dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Association**. v. 187, p. 625-627, 1985.

PINTO, E. S. L. Algodão e trópico. **Anais do Seminário de Tropicologia, Universidade Federal de Pernambuco**, v.2, p.320-342, 1976.

QIAN, S. Z. et al. Gossypol related hypocalcemia. *Clinicopharmacologic studies*. **China Medicine Journal**. V. 93, p. 477-482, 1980.

QIAN, S. Z.; WANG, Z. G. Gossypol: a potential antifertility agent for males. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. V. 24, p. 329-360, 1984.

RAUBER, C. **Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassau Composto®) em ratos Wistar**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS. 2006.

REYNOLDS, J. M.; TONE, J. N. Subchronic oral administration of gossypol-acetic acid (GAA) alters the distribution and utilization of radioiron in male rats. **Drug and Chemistry Toxicology**. v. 11, p. 135-150, 1988.

SAKSENA, S. K. et al. Gossypol: its toxicological and endocrinological effects in male rabbits. **Contraception**. v. 24, p. 203-214, 1981.

SALOMOV, I.T. et al. Effect of pectin additives from cotton on the physical development, nutrition and erythrocytes in infants. **Vopr Pitan**. v. 6, p. 16-18, 1994.

SEPEHRI, H.; RENARD, C.; HOUEBINE, L.M. Beta-glucan and pectin derivatives stimulate prolactin secretion from hypophysis in vitro. **Proceedin of Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 194, p. 193-197, 1990.

SEPEHRI, H.; ROGHANI, M.; HOUEBINE, M.L. Oral administration of pectin-rich plant extract enhances C3 and C4 complement concentration in woman colostrum. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 38, p. 255-260, 1998.

SHARAPIN, N. Normatização da Indústria Farmacêutica. In: **Seminário sobre industrialización y Legalización de Productos Fitofarmacéuticos en Iberoamérica e Reunión Construtiva de la Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos**, Guatemala, p. 42-44, 1996.

SILVA, M. A.; KOZICKI, L. E.; DALSENTER, P. R. Toxicidade do gossypol na gestação e na lactação de ratas (*Rattus rattus norvegicus*). **Archives of Veterinary Science**. v. 7. p. 87-98, 2002.

THURMAN, R. G.; BRADFORD, B. U.; IIMURO, Y.; FRANKENGERG, M. V.; KNECHT, K. T.; CONNOR, H. D.; ADACHI, Y.; WALL, C.; ARTEEL, G. E.; RALEIGH, J. A.; FORMAN, D. T.; MASON, R.P. Mechanisms of alcohol-induced hepatotoxicity: studies in rats. **Front biosciences**. v. 4, p. 42-46, 1999.

UZAL, P. A. Gossypol toxicosis in a dog consequent to ingestion of cottonseed bedding. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 17, p. 626-629, 2005

WEINBAUER , G.F.; ROVAN, E.; FRICK, J. Antifertility efficacy of gossypol acetic acid in male rats. **Andrologia**. v. 14, p. 270-275, 1982.

WEINBAUER , G.F.; ROVAN, E.; FRICK, J. Toxicity of gossypol at antifertility dosages in male rats: statistical analysis of lethal rates and body weight responses. **Andrologia**. v. 15, p. 213-221. 1983.

WHO. Guidelines for toxicity investigation of herbal medicines In: **Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines**, p. 35-40, 1993.

WOJCIKOWSKI, K.; JOHNSON, D. W.; GOBÉ, G. Medicinal herbal extracts-renal friend or foe? Part one: The toxicities of medicinal herbs. **Nephrology**. v. 9, p. 313-318, 2004.

WU, G. P. Gossypol and its related compounds as contraceptive drugs and drugs for gynecological diseases. **Shengzhi Yu Biyun**. v. 8, p. 3-8, 1988.

WU, Y. M.; CHAPPEL, S. C.; FLICKINGER, G. L. Effects of gossypol on pituitary-ovarian endocrine function, ovulation and fertility in female Hamsters. **Contraception**. v. 24, p. 259-268, 1981.

YU, Z. H.; CHAN, H.C. Gossypol and hypocalcemia: a critical review. **Contraceptive Systems**. v. 10, p. 23-33, 1994.

ZHANG, Y. W.; HAN, M. L.; WANG, Y. F. [Estrogen and progesterone cytosol concentrations in patients with endometriosis and their changes after gossypol therapy]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**. v. 29, p. 220-223, 1994.