

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BENEDITO DE SOUZA GUIMARÃES JUNIOR

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO METANÓLICO DAS RAÍZES DE *Amasonia*
campestris Lamiaceae.**

**MACAPÁ
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.32

G963a Guimarães Junior, Benedito de Souza.

Avaliação pré-clínica da toxicidade aguda e atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes de *Amazonia campestris* Lamiaceae / Benedito de Souza Guimarães Junior, orientadora, Alessandra Azevedo do Nascimento – Macapá, 2015.

51 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Toxicidade aguda. 2. Diabetes mellitus. 3. Hipoglicemiantes. 4. *Amazonia campestris*. I. Nascimento, Alessandra Azevedo do, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

BENEDITO DE SOUZA GUIMARÃES JUNIOR

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO METANÓLICO DAS RAÍZES DE *Amazonia*
campestris Lamiaceae.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Azevedo do Nascimento.

**MACAPÁ
2015**

BENEDITO DE SOUZA GUIMARÃES JUNIOR

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA E ATIVIDADE
HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO METANÓLICO DAS RAÍZES DE *Amasonia*
campestris Lamiaceae.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá-UNIFAP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Data de Aprovação: 07 / Abril / 2015

Prof^a. Dr^a. Alessandra Azevedo do Nascimento
Orientador(a) - UNIFAP

Deyse de Souza Dantas

Prof^a. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Souza
Avaliador 1 - UNIFAP

Deyse de Souza Dantas

Prof^a. Dr^a. Deyse de Souza Dantas
Avaliador 2 - UNIFAP

Aos meus pais Benedito e Natalina Guimarães, irmãos Rosileicy, Renilton e Rosilete Guimarães, meu filho Carlos Henrique Guimarães e minha esposa Vanda Costa. Pelo apoio em todos os momentos da minha vida e para concretização desse grande passo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sabedoria.

À minha orientadora, Alessandra Azevedo do Nascimento pela dedicação empenho e paciência e principalmente por ter acreditado no meu projeto e repassado todo conhecimento e destreza para que fosse concretizado.

Aos integrantes do Laboratório de experimentação animal e do grupo de pesquisa Bioativos Amazônicos pelo apoio e cuidado com os animais durante os experimentos e pela experiência trocada.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá.

À agência de Fomento CAPES pelo apoio na concessão da bolsa de pesquisa.

À minha família pelo apoio incondicional e incentivo a concretização de um sonho.

“Deixa que a tua comida seja o teu remédio e que o teu remédio seja a tua comida.”

Vicki Pitman

RESUMO

A *Amazonia campestris* é uma planta da família *Lamiaceae* utilizada popularmente como terapia complementar no tratamento do *Diabetes mellitus*. Apesar de seu difundido uso pelas comunidades locais não existem relatos científicos que garantam a segurança ou a eficácia do emprego terapêutico desta espécie. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e a atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes de *Amazonia campestris* (EMAC). Para tanto realizou-se um teste preliminar de bioatividade do extrato frente a *Artemia salina* para determinação da concentração letal mediana (CL_{50}) e em seguida avaliou-se a toxicidade aguda conforme preconizado pela RE 90/2004 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Ratos Wistar machos ($n=12$), divididos em dois grupos, receberam, respectivamente, EMAC (2000 mg/kg, v.o) e o veículo (controle). Sinais gerais de toxicidade, bem como a evolução ponderal, consumo de água e ração e grau de letalidade do extrato foram observados durante 14 dias. Ao fim deste período, parâmetros hematológicos e bioquímicos, bem com análise macroscópica e cálculo da massa relativa de órgãos vitais (coração, fígado, pulmões e rins) também foram determinados. Para o teste de tolerância oral a glicose (TOTG) 18 animais normoglicêmicos, distribuídos em 3 grupos receberam diferentes tratamentos: veículo (controle negativo), Metformina 500 mg/kg (controle positivo) e EMAC (400 mg/kg) (teste). Após sobrecarga de glicose, a glicemia foi determinada nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. No teste com animais diabéticos induzidos por aloxano (120 mg/kg). Foram utilizados um grupo controle negativo (veículo), grupo controle positivo (Glibenclamida, 5 mg/kg) e 2 grupos testes de EMAC (200 e 400 mg/kg, respectivamente). Nestes grupos foram realizadas coletas de glicemia nos tempos 0h, 6h, 24h, 4ºdia e 6ºdia após respectivos tratamentos. A coleta de sangue para exames de colesterol e triglicerídeos foi feita ao fim do sexto dia. A CL_{50} determinada através do bioensaio em *A. salina* foi de 248,57 µg/ml demonstrando que a planta é detentora de constituintes ativos. Nos animais expostos agudamente ao EMAC (2000 mg/kg) não se evidenciou mortes, alterações comportamentais, modificações no consumo de água e ração nem alterações dos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, em relação ao grupo controle. Aspectos macroscópicos e massa relativa dos órgãos apresentaram dentro da normalidade, a exceção de uma pequena alteração no peso relativo renal. O teste oral de tolerância o grupo tratado com extrato apresentou redução significante da glicemia no tempo 90 minutos com ($p<0,00241$). Durante o tratamento de 6 dias com os animais diabético induzidos, 6 horas após a primeira administração foi observado uma redução significativa da glicemia com a dose 400mg/kg ($p=0,05$) de extrato, fato esse que se repetiu no quarto dia de tratamento ($p=0,001$). Na avaliação ponderal tanto os animais tratados com extrato (200mg/kg e 400mg/kg, v.o) como com a glibenclamida não apresentaram alterações significativas. EMAC (400mg/kg, v.o) promoveu redução expressiva nos níveis plasmáticos de colesterol e aumento de triglicerídeos em todos os grupos de tratamento. Diante destes resultados podemos inferir que o extrato metanólico de *Amazonia campestris* possui baixa toxicidade e é detentor de atividade hipoglicemiante, porém uma compreensão mais aprofundada de seus mecanismos terapêuticos, bem como da segurança do uso por períodos mais prolongados deveram ser melhor elucidadas.

Palavras-chave: Toxicidade aguda. *Diabetes mellitus*. Hipoglicemiante. *Amazonia campestris*.

ABSTRACT

The *Amazonia campestris* is a family Lamiaceae plant popularly used as a complementary therapy in the treatment of diabetes mellitus. Despite its widespread use by local communities there are no scientific reports to ensure the safety or efficacy of the therapeutic use of this species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the acute toxicity and the hypoglycemic activity of the methanol extract of the roots of *Amazonia campestris* (EMAC). Therefore we carried out a preliminary bioactivity of front extract the brine shrimp to determine the median lethal concentration test (LC₅₀) and then evaluated the acute toxicity as recommended by RE 90/2004 of National Health Surveillance Agency - ANVISA. Male Wistar rats (n=12) were divided into two groups received, respectively, EMAC (2000 mg/kg, v.o.) and the vehicle (control). General signs of toxicity and body weight gain, water and food consumption and degree of lethality extract were observed for 14 days. At the end of this period, haematological and biochemical parameters, as well as macroscopic analysis and calculation of the relative mass of vital organs (heart, liver, lung and kidney) were also determined. For the oral glucose tolerance test (TOTG) 18 normoglycemic animals distributed in 3 groups received different treatments: vehicle (negative control), Metformin 500 mg/kg (positive control) and EMAC (400 mg/kg) (test). After glucose load, blood glucose was determined at 30, 60, 90 and 120 minutes. In the test animals with diabetes induced by alloxan (120 mg/kg). A negative control group were used (vehicle), positive control group (Glibenclamide 5 mg/kg) and EMAC 2 test groups (200 and 400 mg / kg, respectively). These groups glucose samples were taken at the times 0h, 6h, 24h, Day 4 and Day 6 after their treatments. The collection of blood cholesterol and triglycerides tests was made at the end of the sixth day. The LC₅₀ determined by bioassay *A. salina* was 248.57 µg/mL demonstrating that holds the plant active constituents. In animals exposed acutely to EMAC (2000 mg/kg) there was no evidence deaths, behavioral changes, changes in the consumption of water and feed or changes in biochemical and hematological parameters evaluated in the control group. Macroscopic aspects and relative mass of the organs showed normal, the exception of a slight change in kidney relative weight. The oral tolerance test group treated with extract showed significant reduction in blood glucose over time to 90 minutes ($p<0.00241$). During the 6 day treatment with induced diabetic animals 6 hours after the first administration was observed a significant reduction in blood glucose at a dose 400 mg/kg ($p=0.05$) extract, a fact that was repeated on the fourth day treatment ($p=0.001$). In weight assessment both animals treated with extract (200mg/kg and 400mg/kg, v.o.) as with glyburide showed no significant changes. EMAC (400mg/kg, v.o.) produced significant decrease in plasma cholesterol and triglycerides increased in all treatment groups. Given these results we can infer that the methanol extract of *Amazonia campestris* has low toxicity and is holder of hypoglycemic activity, but a deeper understanding of its therapeutic mechanisms as well as the safety of use for longer periods were to be better elucidated.

Keywords: Acute toxicity. *Diabetes mellitus*. Hypoglycemic. *Amazonia campestris*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 GERAL.....	11
2.2 ESPECÍFICOS.....	11
3 CPÍTULO 1	12
3.1 EFEITO HIPOGLICEMIANTE E AVALIAÇÃO DA BIOATIVIDADE DO EXTRATO METANÓLICO DAS RAÍZES de <i>Amazonia campestris</i> (Lamiaceae).....	12
4 CAPITULO 2.....	31
4.1 AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>Amazonia campestris</i> Lamiaceae.....	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO 1-PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	52
ANEXO 2-TOXIDADE AGUDA-TABULAÇÃO DE DADOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A *Diabetes mellitus* é uma síndrome que se tornou um problema de saúde pública em virtude de sua expressiva incidência e prevalência. Patologia está que apresenta uma deterioração progressiva do organismo em consequência das desordens metabólicas e estados hiperglicêmicos causados pela falta da produção, excreção ou ação da insulina. Essa desordem metabólica faz com que as pessoas apresentem sintomas como: poliúria, polifagia, polidipsia, perda de peso, ou outros que variam de acordo com os índices glicêmicos.

Isso faz com que a *Diabetes mellitus* seja considerada uma das doenças incuráveis crônicas mais comuns no mundo, com uma prevalência epidemiológica que movimenta a preocupação dos órgãos de saúde do mundo inteiro, principalmente pelos danos colaterais que os pacientes apresentam em longo prazo.

O Estado do Amapá integra parte da Amazônia Legal, dispondo de uma rica biodiversidade e possui uma cultura centrada nos costumes de povos indígena e remanescentes quilombolas, cujas práticas culturais remetem a utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos.

A *Amazonia campestris* é uma espécie encontrada na Venezuela, Trinidad e Tobago, Guianas, Suriname e Brasil (MOLDENKE, 1982). Sendo, no Brasil, encontrada no Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás. Com indicação popular para o tratamento do Diabetes, inclusive por pessoas que não dispõe de acesso a assistência à saúde e medicamentos, representando uma alternativa terapêutica para muitas destas pessoas. Diante dessa prática popular existe a necessidade do estudo científico de tal espécie sobre o ponto de vista da comprovação da eficácia terapêutica como agente hipoglicemiante e também garantindo a segurança de sua utilização.

Estudos de avaliação toxicológica da espécie *Amazonia campestris* não são relatados na literatura científica, o que torna necessária a realização desta pesquisa em função do difundido uso popular da espécie e do cumprimento de etapas para registro de um provável fitoterápico a base deste vegetal junto a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Uma vez que a segurança no uso de qualquer medicamento é condição sine qua non para viabilização de registro e comercialização.

A viabilização de novos medicamentos fitoterápicos esbarra em diversas características que estes produtos devem apresentar segundo a Resolução RDC n° 26/2014, da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que dispõem sobre o registro destes

medicamentos. Estas etapas servem para assegurar a eficácia, a qualidade e a segurança no uso destas plantas.

Com base no conhecimento empírico sobre o efeito do chá das folhas e raízes da *Amazonia campestris* utilizado como tratamento complementar da *Diabetes mellitus*, sendo que a atividade farmacológica no controle do diabetes ainda não é conhecida, surge a necessidade de investigar o possível o potencial toxico e hipoglicemiante do extrato metanólico da *Amazonia campestris* (EMAC) para avaliar a eficácia de seu uso popular, e ter uma ideia na segurança do uso e possivelmente cumprir etapas para registro de um novo produto fitoterápico.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

- Avaliar toxicidade aguda e atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de raízes de *Amazonia campestris* e estimar bioatividade da planta através de bioensaio frente à *Artemia salina*.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Estimar a bioatividade do extrato metanólico das raízes de *Amazonia campestris* (EMAC) através de bioensaio frente à *Artemia salina*.
- Avaliar comportamentalmente os animais expostos agudamente ao EMAC e verificar a influência deste sobre a ocorrência de possíveis alterações na evolução ponderal e no consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos dos animais experimentais;
- Investigar atividade hipoglicemiante de EMAC em ratos normoglicêmicos através de teste oral de tolerância a glicose.
- Avaliar atividade hipoglicêmica de EMAC em ratos diabéticos induzidos por Aloxano, e tratados com o extrato.

3 CAPÍTULO 1

Revista Ciência & Saúde Coletiva (Qualis B2 – Farmácia)

3.1 Efeito hipoglicemiante e avaliação da bioatividade do extrato metanólico das raízes *Amazonia campestris* (*Lamiaceae*).

Hypoglycemic effect and evaluation of bioactivity of the methanol extract of the roots *Amazonia campestris* (*Lamiaceae*).

Benedito de Souza Guimarães Junior

Alessandra Azevedo do Nascimento

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes de *Amazonia campestris* (EMAC) e testar sua bioatividade frente *Artemia salina*. Para tanto realizou-se um teste preliminar de bioatividade do extrato frente a *Artemia salina* para determinação da concentração letal mediana (CL₅₀) e em seguida procedeu o teste de tolerância oral a glicose (TOTG), onde 18 animais normoglicêmicos, distribuídos em 3 grupos receberam diferentes tratamentos: veículo (controle negativo), Metformina 500 mg/kg (controle positivo) e EMAC (400 mg/kg) (teste). Após sobrecarga de glicose, a glicemia foi determinada nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. No teste com animais diabéticos induzidos por aloxano (120 mg/kg). Foram utilizados um grupo controle negativo (veículo), grupo controle positivo (Glibenclamida, 5 mg/kg) e 2 grupos testes de EMAC (200 e 400 mg/kg, respectivamente). Nestes grupos foram realizadas coletas de glicemia nos tempos 0h, 6h, 24h, 4ºdia e 6ºdia após respectivos tratamentos. A coleta de sangue para exames de colesterol e triglicerídeos foi feita ao fim do sexto dia. A CL₅₀ determinada através do bioensaio em *A. salina* foi de 248,57 µg/ml demonstrando que a planta é detentora de constituintes ativos. O teste oral de tolerância o grupo tratado com extrato apresentou redução significante da

glicemia no tempo 90 minutos com ($p<0,00241$). Durante o tratamento de 6 dias com os animais diabético induzidos, 6 horas após a primeira administração foi observado uma redução significativa da glicemia com a dose 400mg/kg ($p=0,05$) de extrato, fato esse que se repetiu no quarto dia de tratamento ($p=0,001$). Na avaliação ponderal tanto os animais tratados com extrato (200mg/kg e 400mg/kg, v.o) como com a glibenclamida não apresentaram alterações significativas. EMAC (400mg/kg, v.o) promoveu redução expressiva nos níveis plasmáticos de colesterol e aumento de triglicerídeos em todos os grupos de tratamento. Diante destes resultados podemos inferir que EMAC é detentor de compostos bioativos já que sua CL_{50} foi inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ e ainda apresenta um considerável efeito hipoglicemiante. (CEUA-UNIFAP 01/2015).

Descritores: *Diabetes mellitus*; Hipoglicemiante; *Amazonia campestris*, *Artemia salina*.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the hypoglycemic activity of the methanol extract of the roots of *Amazonia campestris* (EMAC) and test its bioactivity front *Artemia salina*. Therefore we carried out a preliminary test the bioactivity front extract the brine shrimp to determine the median lethal concentration (CL_{50}) and then proceeded to the oral glucose tolerance test (TOTG), where 18 normoglycemic animals, divided into 3 groups received treatments: vehicle (negative control), Metformin 500 mg/kg (positive control) and EMAC (400 mg/kg) (test). After glucose load, blood glucose was determined at 30, 60, 90 and 120 minutes. In the test animals with diabetes induced by alloxan (120 mg/kg). A negative control group were used (vehicle), positive control group (Glibenclamide 5 mg/kg) and EMAC 2 test groups (200 and 400 mg/kg, respectively). These groups glucose samples were taken at the times 0h, 6h, 24h, Day 4 and Day 6 after their treatments. The collection of blood cholesterol and triglycerides tests was made at the end of the sixth day. The CL_{50} determined by bioassay A.

salina was 248.57 ug/ml demonstrating that holds the plant active constituents. The oral tolerance test group treated with extract showed significant reduction in blood glucose over time to 90 minutes ($p<0.00241$). During the 6 day treatment with induced diabetic animals 6 hours after the first administration was observed a significant reduction in blood glucose at a dose 400 mg/kg ($p=0.05$) extract, a fact that was repeated on the fourth day treatment ($p=0.001$). In weight assessment both animals treated with extract (200mg/kg and 400mg/kg, v.o.) as with glyburide showed no significant changes. EMAC (400mg/kg, v.o.) produced significant decrease in plasma cholesterol and triglycerides increased in all treatment groups. Given these results we can infer that EMAC is holder of bioactive compounds since its LC50 was less than 1000 mg/ml and still has a considerable hypoglycemic effect. (CEUA-UNIFAP 01/2015).

Keywords: *Diabetes mellitus*; hypoglycemic; *Amazonia campestris*, *Artemia salina*.

Introdução

A *Diabetes mellitus* é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente de defeitos na ação ou secreção da insulina, ou ambos. Esta desordem metabólica é caracterizada por hiperglicemia crônica, cujos principais sintomas incluem poliúria (aumento do volume urinário) polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e significativa perda de peso¹. Uma das doenças incuráveis crônicas mais comuns, com uma prevalência epidemiológica que movimenta a preocupação dos órgãos de saúde do mundo inteiro, principalmente pelos danos colaterais que os pacientes apresentam em longo prazo.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o mundo encontra-se hoje no centro de uma epidemia diabética. No ano de 1985 estimava-se que havia 30 milhões de pessoas diabéticas em todo o mundo, número este que aumentou drasticamente em um período de dez anos, chegando a 135 milhões de pessoas diabéticas. Estimativas apontam que no ano de

2030, este número deve alcançar 366 milhões de pessoas com esta síndrome, dos quais 90% apresentarão diabetes tipo 2 e hoje, no Brasil, estima-se que haja cerca de 12 milhões de pessoas diabéticas².

A utilização de plantas medicinais tem aparecido com resultados satisfatórios nas pesquisas, o potencial hipoglicemiante obtido a partir de princípios ativos de origem vegetal. As informações etnobotânicas relatam que aproximadamente 800 plantas possuem potencial anti-diabético³. No Brasil, muitas espécies tropicais, são utilizadas popularmente como medicinais por comunidades quilombolas, ribeirinhas, rurais, tradicionais e indígenas⁴. O uso popular de plantas como hipoglicemiantes vem sendo significativamente comprovado através de pesquisas científicas.

O Estado do Amapá integra parte da Amazônia Legal, dispondo de uma rica biodiversidade e possui uma cultura centrada nos costumes de povos indígena e remanescentes quilombolas, cujas práticas culturais remetem as plantas medicinais. A *Amazonia campestris* é uma planta utilizada popularmente no tratamento do Diabetes, inclusive por pessoas que não dispõe de acesso a assistência à saúde e medicamentos, representa a alternativa terapêutica para muitas destas pessoas. Diante dessa prática popular existe a necessidade do estudo científico de tal espécie sobre o ponto de vista da comprovação da eficácia terapêutica como agente hipoglicemiante e também garantindo a segurança de sua utilização.

Amazonia campestris é uma espécie que ocorre na Venezuela, Trinidad e Tobago, Guianas, Suriname e Brasil. Sendo, no Brasil, encontrada no Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás⁵. Conhecida popularmente por “herva de picapão”, “mendóca”, “rabo de arara”, “cacho vermelho”, “cola de galo”, “varita de San José” e “farfara roja”, não apresenta estudos relatados cientificamente quanto a suas propriedades hipoglicemiantes, nem estudos de toxicidade⁶. Os populares utilizam folhas e raízes deste

vegetal na forma de infusão e decocção, respectivamente, para auxiliar no tratamento do diabetes.

A viabilização de novos medicamentos fitoterápicos esbarra em diversas características que estes produtos devem apresentar segundo a RDC 26/2014 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, que dispõem sobre o registro destes medicamentos. Assim os testes farmacológicos e toxicológicos utilizando animais são considerados como etapa imprescindível da pesquisa de novos produtos destinados ao uso em humanos inclusive os medicamentos fitoterápicos⁷. Estas fases tem o objetivo de garantir a eficácia, a qualidade e a segurança na utilização destes produtos, assim como prover adequadas informações aos usuários mediante o registro e regulamentação pertinente, constituem importantes desafios para os momentos atuais.

Com base no conhecimento empírico sobre o efeito do chá das folhas e raízes da *Amazonia campestris* utilizado no tratamento da *Diabetes mellitus*, mas sem nenhum estudo que comprove sua eficácia surge a necessidade de se investigar o possível o potencial citotóxico e hipoglicemiante do extrato metanólico da *Amazonia campestres* e possivelmente cumprir etapas para registro de um novo produto fitoterápico.

Método

Material botânico

As raízes de *Amazonia campestris* foram coletadas no município de Macapá-AP, no polo hortifrutigranjeiro com localização GPS: Latitude: -0.03716 e Longitude: -51.00077 em um raio de 25 metros. A partir do espécime coletado preparou-se uma exsicata que foi encaminhada e depositada com n° 015418 no Herbário Amapaense do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá.

Obtenção do extrato metanólico de Amazonia campestris (EMAC)

O material botânico foi seco a 40°C por 72 h, em estufa de ar circulante, e triturado em moinho de facas. O triturado resultante seguiu com processo de maceração a frio em metanol na proporção de 1/5 do líquido extrator em relação ao peso da amostra durante 7 dias. O macerado foi homogeneizado com agitação periódica para facilitar a extração dos constituintes ativos da planta. Após filtração foi obtido um extrato de coloração dourada, logo concentrou-se o extrato em evaporador rotativo a 45°C até total evaporação do solvente, resultando no extrato metanólico bruto de *Amazonia campestris* (EMAC).

Logo após a rotaevaporação do EMAC, realizou-se o cálculo do rendimento geral do extrato. Obtendo o Rendimento geral de 1,756%. Utilizando a seguinte fórmula:
Re=(Peb/Prt)x100. Sendo Re: o rendimento total do extrato (%); Peb: peso do extrato bruto (g); Prt: peso das raízes trituradas.

Para a realização dos testes, preliminarmente o extrato foi diluído com 0,5% de tween 80, uma solução previamente escolhida após teste de solubilidade. A quantidade utilizada do extrato concentrado seguiu conforme tipo de estudo e peso corpóreo dos animais.

Bioensaio com Artemia salina

Os cistos de *Artemia salina* L. foram mantidos sob refrigeração a 4°C até a execução do experimento. Larvas de *Artemia salina* L., na forma de metanáuplio, foram empregadas para a determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀) como parâmetro de avaliação da atividade biológica⁸. Para a obtenção dos metanáuplios, cistos de *Artemia salina* foram incubados em solução salina (pH 8,5 e 29°C) sob iluminação artificial por 48h. Após eclosão ocorreu a migração dos metanáuplios de uma placa perfurada para outro compartimento com livre incidência de luz. A partir de uma solução de 10 mg/ml de EMAC foram efetuadas diluições para obtenção de diferentes concentrações (1000 – 1 µg/mL). Cada tubo foi tinhado um volume final de 5mL de solução já acréscidos com as respectivas concentrações onde 10 metanáuplios foram adicionados, a cada tubo.

O teste foi realizado em triplicata e em duas etapas. Um grupo controle também preparado contendo apenas solução salina, que foi empregado como solvente para o extrato, e as larvas. O conjunto permaneceu em incubação sob luz artificial por 24 h e então foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas para determinação da CL₅₀ de acordo com o método estatístico de Probitos utilizando o programa Graph Pad prism 6.0.

Ensaios pré-clínicos com animais

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas normoglicêmicas, pesando entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério do LACEN-AP. Os animais foram aclimatados por um período de 7 dias antes da realização dos experimentos em nosso laboratório. Mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas (6 - 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água.

Todos os protocolos foram submetidos à apreciação do comitê de Ética em Pesquisa para o uso de animais da Universidade Federal do Amapá (CEUA – UNIFAP) e posteriormente aprovados com protocolo 01/2015 (Anexo 1).

Teste Oral de Tolerância à Glicose

O efeito anti-hiperglicemiante agudo do extrato metanólico das raízes da *Amazonia campestris* foi avaliado através da análise das curvas obtidas a partir do teste oral de tolerância à glicose⁹. Para realização deste teste foram utilizados 18 animais normoglicêmicos divididos em 3 grupos, compostos por 6 animais cada. Os grupos foram definidos como: grupo controle negativo tratado com veículo; Grupo controle positivo tratado com Metformina, na dose de 500 mg/kg, uma droga de referência e o grupo experimental tratado com *Amazonia campestris*, na dosagem de 400 mg/kg.

Antes dos experimentos, todos animais foram colocados em jejum não hídrico durante 12h. Após este período, procedeu-se uma glicemia em jejum que foi definida como tempo 0 (zero). Após este procedimento, os animais receberam seus respectivos tratamentos pela via

oral e decorridos 30 minutos se administrou glicose na dose de 3 g/kg. A glicemia foi então medida nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. Os valores da glicemia foram obtidos através de fitas reagentes (ACCU-CHEK Advantage II, Roche) acopladas a um glicosímetro digital portátil a partir de amostras de sangue coletadas da cauda.

Indução do Diabetes mellitus com Aloxano

O *Diabetes Mellitus* foi induzido através de injeção intraperitoneal em dose única de Aloxano (Alloxan Monohydrate Sigma®) na concentração de 120 mg/kg de peso, diluído em solução de NaCl a 0,9% estéril. Decorridos 30 minutos do tratamento, os animais foram alimentados normalmente e receberam uma solução de glicose 10% como única fonte hídrica, durante 24 horas. Após 7 dias da indução, os animais foram subdivididos em um grupo controle e 3 grupos de intervenção. Dos animais submetidos à indução, só comporão os grupos experimentais aqueles cuja glicemia foi superior a 190 mg/dL.

Os ratos diabéticos foram divididos em 4 grupos (n=4, cada). Sendo o grupo controle negativo tratado com veículo (NaCl 0,9% com 0,5% de Tween 80), o grupo controle positivo tratado com um fármaco padrão (Glibenclamida, 5mg/kg), o grupo teste 1 (EMAC, 200 mg/kg) e o grupo teste 2 (EMAC, 400 mg/kg). Os tratamentos foram, todos, por via oral (gavagem) e transcorrido os intervalos de 0, 6 e 24h, após cada administração, procedeu-se a coleta de sangue (veia caudal) para determinação de glicemia. Diariamente foram repetidos os respectivos tratamentos por 6 dias. Findado este período e sob jejum de 8 horas, procedeu-se a coleta de sangue dos animais por punção cardíaca, três horas após o último tratamento, para análise da glicemia, triglicerídeos e colesterol¹⁰.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e para comparação entre as médias empregou-se o teste *t*-student ou ANOVA, seguida de Bonferroni utilizando o programa Graph Pad Prism versão 6.0. O nível de significância considerado foi de 95% ($p<0,05$).

Ao final do período experimental os animais, foram previamente anestesiados com Quetamina 90mg/Kg e Xilasina 10mg/kg de peso corporal, e eutanasiados por exsanguinação através de punção cardíaca, conforme norma do CONCEA. A confirmação da morte ocorreu a partir da observação de ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos.

Resultados

Avaliação da bioatividade de EMAC frente a Artemia salina.

Como ensaio preliminar deste estudo foi realizado o teste de bioatividade sobre *Artemia salina*, expondo estes microcrustáceos até elevadas concentrações (1 - 1000 µg/mL) de EMAC para cálculo da CL₅₀. A CL₅₀ de extratos determinada por este método indica bioatividade, se inferior a 1000 µg/mL (MEYER et al, 1992). O valor médio da CL₅₀ de EMAC obtido a partir deste teste foi de CL₅₀=248,57µg/mL. Indicando que EMAC apresenta em sua constituição compostos bioativos.

Avaliação do efeito de EMAC sobre o perfil de resistência insulínica em ratos.

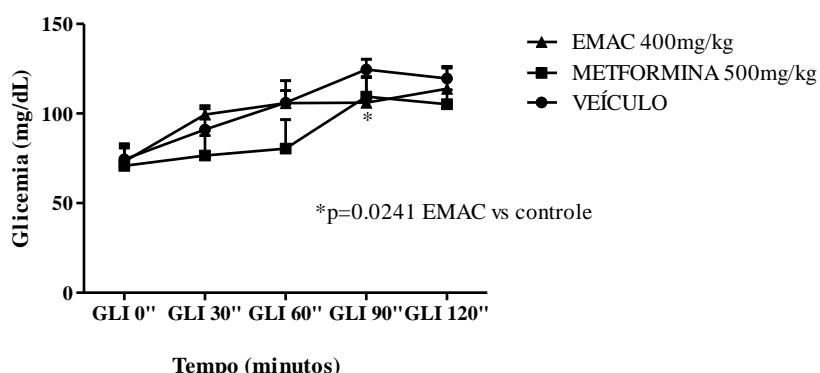


Figura 1. Efeito do Extrato bruto da *Amazonia campestris* em ratos normoglicêmicos submetidos a teste oral de tolerância a glicose. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m., n=5 versus o controle (ANOVA).

A glicemia de todos os animais foi avaliada no (tempo 0) após jejum de 12 horas. Seguido do primeiro teste de glicemia os animais foram tratados com Metformina (500 mg/kg) e EMAC (400 mg/kg) Via oral, após o tratamento o experimento seguiu com testes de

glicemia nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos após a administração de uma sobrecarga de glicose via oral. O teste revelou redução da glicemia com EMAC ($106,00 \pm 6,50$ mg/dL) ao nível da Metformina ($109,40 \pm 4,78$ mg/dL) no tempo 90 minutos e uma taxa glicêmica menor que o veículo no tempo 120 minutos.

Avaliação da glicemia em rato diabético induzido por aloxano e tratado com EMAC

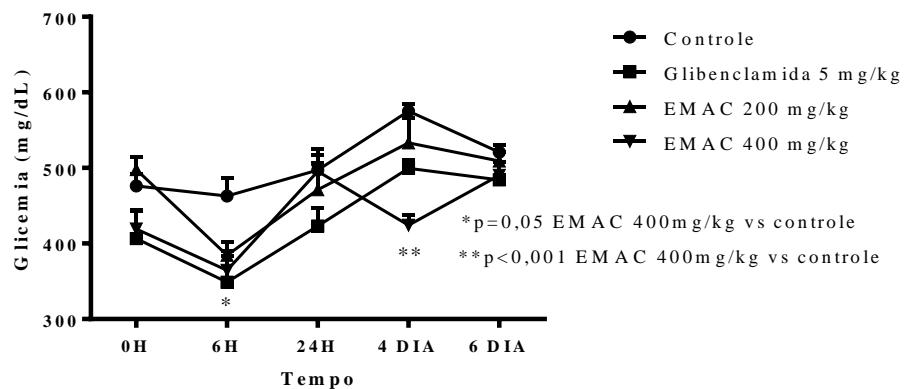


Figura 2. Avaliação da glicemia dos animais diabético induzidos durante os 5 dias de tratamento com EMAC (200 e 400 mg/ kg), Glibenclamida e Veículo. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m., n=5 versus o controle (ANOVA).

Diante dos resultados expostos onde foi evidenciado uma redução da glicemia no tempo 90 minutos nos animais. O experimento seguiu com tratamento de 5 dias com EMAC em ratos diabéticos induzidos com Aloxano. Durante o tratamento, nas primeiras 6h após administração da 1° dose, os tratamentos com EMAC 400 mg/kg ($364,5 \pm 26,1$ mg/dL) apresentou resultados próximos em comparação com os tratamentos com EMAC 200 mg/kg ($384,5 \pm 18,0$ mg/dL) e proximidade com os efeitos da Glibenclamida 5 mg/kg ($348,7 \pm 34,2$ mg/dL). Com a continuação do tratamento a dose de 400 mg/kg durante o 4º dia de administração apresentou ($424,2 \pm 13,0$ mg/dL), uma glicemia acentuadamente menor que os tratamentos com Glibenclamida 5mg/kg ($499,5 \pm 11,4$ mg/dL), EMAC 200 mg/kg ($533,2 \pm 32,3$ mg/dL) com (p<0.001) no (ANOVA seguido de Bonferrone).

Evolução ponderal dos animais diabéticos expostos a EMAC

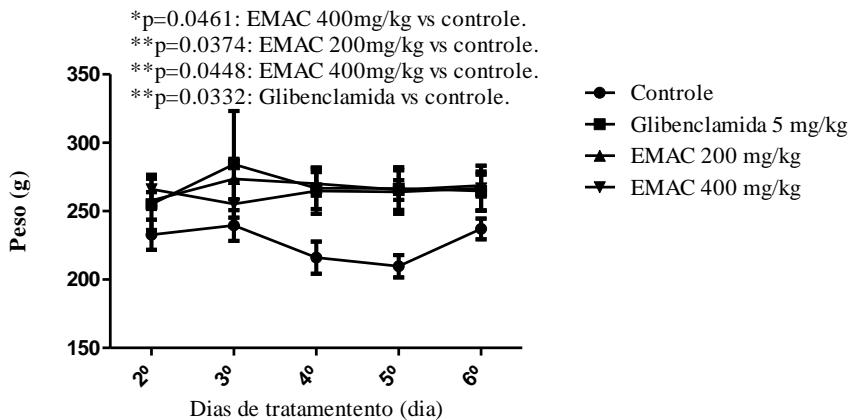


Figura 3. Avaliação do peso dos animais diabético induzidos durante os 5 dias de tratamento com EMAC e Glibenclamida.

A administração de EMAC 200 mg/kg, 400mg/kg e glibenclamida 5mg/kg demonstraram uma manutenção do peso corpóreo dos animais durante os cinco dias de tratamento, onde o grupo tratado com EMAC 200 mg/kg apresentou respectivamente (270.0 ± 8.6 g) e (265.5 ± 7.2 g) o EMAC 400 mg/kg (264.7 ± 16.9 g) e (264.0 ± 15.9 g) e a Glibenclamida 5 mg/kg (266.7 ± 15.1 g) e (266.5 ± 15.5 g) enquanto os animais do grupo controle apresentaram uma acentuada perda de peso totalizando os valores (216.0 ± 11.7 g) e (209.7 ± 8.1 g). Não houve taxa de mortalidade neste experimento.

Avaliação do Colesterol e triglicerídeos em rato diabético induzido por aloxano.

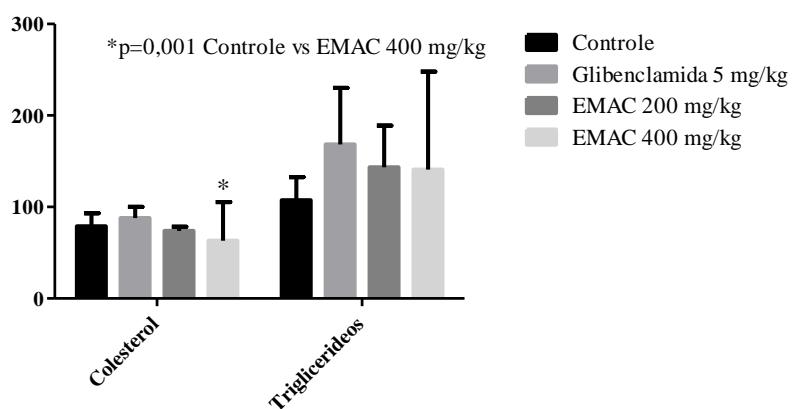


Figura 4. Avaliação do colesterol e triglicerídeos dos animais diabético induzidos durante após o 5º dia de tratamento com EMAC, Glibenclamida e Veículo. O EMAC 400mg/kg apresentou (*p=0,001) quando comparado com o controle (ANOVA).

Após o 5º dia de tratamento e em jejum os animais foram submetidos a uma coleta de sangue através de punção cardíaca para realização das dosagens de colesterol e triglicerídeos. Dentre as alterações do colesterol, a figura 5 demonstra que o tratamento com o EMAC 400 mg/kg média ± e.p.m (60.0 ± 21.1 mg/dL) menor que os outros tratamentos. EMAC 200 mg/kg (73.75 ± 2.3 mg/dL); Glibenclamida 5 mg/kg (87.7 ± 6.1 mg/dL) e veículo com (78.7 ± 7.2 mg/dL) com ($p=0.001$) (ANOVA). Com relação aos triglycerídeos, os tratamentos com EMAC 400 mg/kg (140.7 ± 53.5 mg/dL) e EMAC 200 mg/kg (143.2 ± 22.7 mg/dL) tiveram resultados muito próximos, mas bem menores que as dosagens de triglycerídeos do tratamento com Glibenclamida 5 mg/kg (168.2 ± 30.9 mg/dL).

Discussão

A *Amazonia campestris* é uma planta muito utilizada no Estado do Amapá para o tratamento complementar do *Diabetes Mellitus*. Apesar de até o momento não ter sido encontrado nenhum estudo de atividade hipoglicemiante ou relacionado a mecanismos farmacológicos que levam a redução da taxa de glicemia.

No presente estudo foi realizado bioensaio com *Artemia salina* para obtenção da CL₅₀ e verificada a atividade antihiperglicemiante através do teste oral de tolerância a glicose em ratos normoglicêmicos; hipoglicemiante e controle do peso em animais diabético induzidos por Aloxano e tratados 5 dias com o extrato metanólico da *Amazonia campestris*. Ao final do tratamento ainda foram investigadas as dosagens séricas de colesterol e triglycerídeos.

A *Artemia salina* para realização de triagem citotóxica para estimativa da CL₅₀ se tornou comum nos estudos de plantas utilizadas para fins medicinais. A ausência de citotoxicidade dos extratos testados frente à *Artemia salina* é um indicador de que a planta ou seus órgãos podem ser bem tolerados frente ao sistema biológico. Quando a CL₅₀ obtida é menor que 80 µg/ml a planta é considerada toxica¹¹.

O teste oral de intolerância à glicose é muito utilizado como ensaio preliminar para avaliar se uma planta possui algum possível efeito hipoglicemiante, a droga utilizada neste procedimento é a Metformina da classe das Biguanidas que reduzem a glicemia por mecanismos bastante complexos que ainda não foram elucidados. Mas age aumentando a captação e a utilização no músculo esquelético, e participa da gliconeogênese¹².

A avaliação inicial ocorreu a partir do teste oral de tolerância a glicose realizado com o propósito de investigar a reação do EMAC sobre o metabolismo da glicose diante de uma sobrecarga oral 3 g/kg de glicose. Durante o experimento, conforme observado na figura 1 uma redução significativa da taxa de glicemia no tempo 90 minutos representando um ($*p=0,00241$). De acordo com estudos, após 2h os níveis basais de glicose retornam à normalidade desconsiderando qualquer efeito anti hiperglicemiante após esse tempo¹³.

As pesquisas com indução de diabetes através da utilização de aloxano iniciou-se a partir de 1943. O aloxano é uma perimidina que possui propriedades diabetogênicas através da ação seletiva e destrutiva sobre as células β pancreáticas.

Estudos propõem a indução ao diabetes mellitus em animais experimentais, através da formação de radicais superóxido e hidroxila que possuem determinada especificidade tóxica para tais células, levando à degeneração e morte definitiva das mesmas. Outros sugerem a inibição da secreção de insulina por aloxano é causado por sua interferência com as proteínas citoplasmáticas que contêm grupamentos sulfidril e dissulfídi^{14,15}.

Utilizando o método imunoistoquímico, observou que os pâncreas dos animais com Diabetes mellitus, induzido por aloxano, apresentaram redução de 70% da área da ilhotas ocupada pelas células beta, chegando até a ausência delas¹⁶. A existência de hipoglicemia na presença de hiperinsulinemia que é observada 24 horas após tratamento com aloxano deve ser interpretada pelo desenvolvimento de resistência à insulina induzida por aloxano, podendo

desencadear distúrbios do status redox de outras células além das pancreáticas, as quais são alvos da ação da insulina¹⁷.

O presente estudo utilizou o aloxano como droga para a indução da diabetes e foi obtido 100% de sucesso no procedimento. Após a administração da droga os animais passaram por um período de 7 dias para o desenvolvimento da síndrome. Foi observado que 48 horas após o procedimento de indução os animais já apresentavam sintomas comuns do diabetes como: polidipsia, polaciúria, polifagia e mudança na coloração dos pelos. Autores citam que dos 64 animais submetidos à injeção endovenosa de aloxano, 14 ratos (21,8%) não ficaram diabéticos ou apresentaram diabetes de gravidade leve ou moderada, sendo desprezados. A maioria das pesquisas citam uma taxa de mortalidade em torno de 32%. Para obter uma redução da taxa de mortalidade foi empregado a utilização de após a administração do aloxano os animais receberam glicose a 10% via oral para prevenção de morte devido hipoglicemia severa ocasionada pelo efeito da droga¹⁰.

O tratamento durante 5 dias com EMAC demonstrou uma redução da glicemia dos animais nas primeiras 6 horas tanto nas doses de 200 mg/kg como 400 mg/kg, semelhante a glibenclamida em comparação ao veículo ($*p=0,05$). No 4º dia de tratamento também foi observado redução da glicemia, mas apenas na dosagem 400 mg/kg de extrato com ($**p=0,001$). Estudos realizados com farinha de maracujá (*Passiflora edulis*) apresentaram redução do efeito em 6 h para as menores doses investigadas, com retomada da glicemia basal para a dose de 20 mg/kg, com valores iguais a $518,86 \pm 66,40$ mg/dL e um aumento da glicemia para valores iguais a $367,87 \pm 84,40$ mg/dL na dose de 40 mg/kg¹⁸. Pesquisas realizadas com a *Phyllanthus niruri* revelaram uma diminuição gradual dos níveis de glicose no sangue no grupo de diabéticos com extrato ($139,17 \pm 11,23$ mg / dL) foi observada 22 mg / dL) quando comparado ao grupo controle diabético, que teve o maior valor médio de ($184,17 \pm 7,83$ mg/dL) que revelaram efeito hipoglicemiante da *P. niruri*¹⁹.

Diversas plantas medicinais com potencial hipoglicemiante vêm sendo estudadas e comprovados seus efeitos através de diversos testes farmacológicos, a *Amazonia campestris* demonstrou um efeito hipoglicemiante que deve ser analisado com testes mais complexos para confirmação de biodisponibilidade e dose resposta.

Alguns trabalhos vêm sendo realizados para compreender os mecanismos de ação das plantas medicinais com princípios ativos possuidores de atividade hipoglicemiantes com os seguintes mecanismos bioquímicos: diminuição da absorção de glicose pelo intestino; atuação sobre as células beta do pâncreas, e estimulação da secreção de insulina; inibição da síntese de glicose-6-fosfato ou qualquer enzima que degrade o glicogênio; estimulação do efeito da insulina e da adrenalina; proteção do pâncreas contra o efeito de drogas²⁰.

Assim como o aumento da liberação de insulina através do estímulo das células beta do pâncreas, aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, redução da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; aumento da resistência peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica em lipídeos e proteínas e estimulação para o aumento da microcirculação no organismo²¹. Esses efeitos citados, se comprovados, validam a eficácia de uma planta como hipoglicemiante, pois todos esses mecanismos bioquímicos contribuem para a diminuição da hiperglicemia.

Conforme o esperado após a indução do diabetes com uma dose de 120 mg/kg de aloxano, durante os 6 dias de tratamento com o EMAC resultou em manutenção do peso corpóreo dos animais em índices próximo ao dos animais tratados com glibenclamida 5 mg/kg (Droga de referência), enquanto que os animais tratados apenas com veículo apresentaram uma perda de peso expressiva.

Esses resultados estão em conformidade com outras pesquisas que demonstram a administração de extrato aquoso de *P. niruri*, a uma dose de 200 mg / kg e com a *Morus alba*

em ratos diabéticos, produziu um decréscimo gradual no ganho de peso^{19,22}. A perda de peso é comum em animais diabéticos e é característica da doença, principalmente em estados de hiperglicemia severa.

Os resultados relacionados obtidos das dosagens séricas de colesterol demonstraram uma redução expressiva do colesterol nos animais tratados com o extrato da *Amazonia campestris* quando comparados com o grupo controle e grupo veículo. Os experimentos com *S. oleoides* revelou efeitos benéficos significativos no perfil lipídico em ratos hiperglicêmicos, reduzindo os níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total, LDL, VLDL e, um aumento significante com relação ao HDL²³. Dados estes que contrapõem os resultados desta pesquisa relacionados aos triglicerídeos que apresentaram aumento superior ao grupo controle glibenclamida. Em animais diabéticos o colesterol tende a estar aumentado, assim como a hipertrigliceridemia²⁴. Os extratos de *Bauhinia forficata* possuem propriedades capazes de reduzir a taxa de glicose, triglicerídeos e colesterol, sendo útil no tratamento do diabetes tipo 2²⁵. O Diabetes mellitus sendo considerado uma síndrome que provoca uma modificação no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Essas modificações são responsáveis pelos sintomas apresentados nos estados de hiperglicemia e esses mecanismos também podem auxiliar no tratamento do Diabetes.

Conclusão

O extrato metanólico das raízes da *Amazonia campestris* no teste oral de tolerância a glicose apresentou uma satisfatória redução da glicemia no tempo 90 minutos. Dado que levou a uma investigação com ratos diabéticos induzidos por Aloxano, onde os resultados nas primeiras 6 horas de tratamento com a dose 400mg/kg de extrato e no 4º dia de tratamento também foram obtidos resultados satisfatórios. Durante os 6 dias de tratamento os animais que utilizaram o extrato e glibenclamida tiveram ganho ponderal e manutenção do peso. Ao

final do tratamento os índices de colesterol do grupo com dose 400mg/kg estavam baixos. Portanto o extrato metanólico das raízes da *Amazonia campestris* possui efeito hipoglicemiante. Mas necessita de estudos mais complexos acerca de seu mecanismo de ação, e toxicidade.

Referências

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2011; 34(1): 562-569.
2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diagnóstico e Tratamento do Diabetes Tipo 1. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012.
3. Aguilara FJA, Roman RR, Perez GS, Aguilar CA, Contreras WCC, Flores SJL. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol*. 1998; 61(2): 101-10.
4. Macedo M, Ferreira AR. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2005; 14(1): 45-47.
5. Moldenke HN. Notes on the genus *Amazonia* VIII. In: Gleasson HA.; Moldenke HN. *Phytologia*. 1980; 47(2): 137-140.
6. Santos JS, França F, Silva MJ, Sales MF. Levantamento das espécies de *Amazonia* (Lamiaceae) para o Brasil, Rodriguésia. 2012; 63(4): 1101-1116.
7. Souza Brito ARM. Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo*. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.
8. Lopes WB, et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. *Horizonte Científico*

- [internet], 2004. Acesso em 25/10/2014 Disponível em:
<http://www.propp.ufu.br/revistaelectronica/index.html>.
9. Souza VH, Barbosa APO, Cardoso GC, Marreto RN, Barreto-Filho JAS, Antonioli AR, Santos MRV. Avaliação do Potencial Antidiabético de Cinco Plantas Medicinais em Ratos. Latin American Journal of Pharmacy. 28(4); 2009: 609-612.
 10. Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini AS, Padovani CR. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. Acta Cir. Bras. 2003; 18(2):132-142.
 11. Lacerda AM, Modolo AK, Matias RC, Pistori H, Yano M, Roel AR, et al. Screening of plants with potential phototoxic. Brazilian Journal of pharmacy. 2011; 92(4): 352-355.
 12. RANG, H.P. et al. Farmacologia. 6. ed. Elsevier, 2007.
 13. Silva JPA, Sampaio LS, Oliveira LS, Reis LA. Medicinais Utilizadas por Portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2 para Provável Controle Glicêmico no Município de Jequié-Ba. Revista Saúde Comunitária. 2008; 4(1): 10-18.
 14. Jennische E, Hanson HÁ. Relation between alloxan-induced plasma membrane dysfunction inhibition of insulin secretion in pancreatic B-cells in vivo. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 1986; 94: 153-158.
 15. Bilic N, Felber JP. Diabetogenic Action of Alloxan Following Temporary Interruption of Arterial Blood Flow to Pancreas in Rats. Diabetes February. 1970; 19(2): 81-84.
 16. Lima CN, Medeiros AAN, Oliveira GR, Medeiros FA. Estudo da toxicidade do extrato metanolico das cascas do caule de *Licania Macrophylla* bent. Sobre *Artemia Salina*, Revista Pesquisa e Iniciação Científica – Amapá. 2008; 1(7).
 17. Dornas WC, Nagen TJ, Oliveira TT, Contelli R. Aloxano e Diabetes, Rev. Bras. de Toxic. 2006; 19(2): 81-87.

18. Braga A, Medeiros T P, Araújo B V. Investigaçāo da atividade antihiperglicemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis Sims*, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. *Rev. bras. farmacogn.* 2010; 20(2).
19. Lemos M, Ramos Y, D' Armas ALH. Efecto Hipoglicemiante del Extracto de *Philanthus niruri* (Euphorbiaceae), en ratas diabéticas. *FCV-LUZ.* 2013 23(1): 11-18.
20. Volpato GT, Damasceno DC, Calderom IMP, Rudge MVC. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes Mellitus, Botucatu, *Revista Brasileira de Planta Medicinais.* 2002; 4(2): 35-45.
21. Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas.* 2005; 41(2): 121-142.
22. Mohammadi J, Naik R. Evaluation of hypoglycemic effect of *Morus alba* in an animal model. *Indian Journal of Pharmacology.* 2008; 40(1): 15-18.
23. Yadav JP, Saini S, Kalia AN, Dangi AS. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of ethanolic extract of *Salvadora oleoides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology.* 2008; 40(1): 23-27.
24. Sivaraj A, Devi K, Palani S, Kumar PV, Kumar BS, David E. Anti-hyperglycemic and Anti-hyperlipidemic effect of combined plant extract of *Cassia auriculata* and Aegle marmelos in streptozotocin (STZ) induced diabetic albino rats. *International Journal of PharmTech Research.* 2009; 1(4): 1010-1016.
25. Lino CD, Diogenes JPL, Pereira BA, Faria RAPG, Neto MA, Alves RS, et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forticata* extracts in alloxan-diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27: 125-127.

4 CAPITULO 2

Revista Ciência e Saúde Coletiva (Qualis B2 – Farmácia)

Benedito de Souza Guimarães Junior

Alessandra Azevedo do Nascimento

4.1 Avaliação pré-clínica da toxicidade aguda do extrato metanólico de *Amazonia campestris*

Preclinical evaluation of acute toxicity of cv extract of *Amazonia campestris*

Resumo

A *Amazonia campestris* é uma planta da família Lamiaceae, utilizada popularmente como auxiliar no tratamento de enfermidades como malária e diabetes. Porém não são relatados na literatura científica estudos de avaliação toxicológica que garantam uma administração segura tanto da espécie *in natura*, como na forma de droga vegetal ou de futuro medicamento fitoterápico. Portanto, o objetivo foi avaliar a toxicidade aguda do extrato metanólico das raízes de *Amazonia campestris* (EMAC) em roedores. O experimento ocorreu com 12 ratos Wistar (*Ratos Norvegicus Albinus*) machos expostos agudamente ao EMAC (2000 mg/kg, v.o). Após administração das doses foram observados os sinais gerais de toxicidade, evolução ponderal, consumo de água e ração para mensurar evidencias de ação letal de EMAC durante 14 dias após a exposição. No 15º dia uma amostra do sangue foi coletada para determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Posteriormente os ratos foram eutanasiados para análise macroscópica e cálculo do peso dos órgãos. Nos animais expostos agudamente ao EMAC (2000 mg/kg) não se evidenciou mortes, alterações comportamentais, modificações no consumo de água e ração nem alterações dos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados, em relação ao grupo controle. Aspectos macroscópicos e massa relativa dos órgãos apresentaram dentro da normalidade, a exceção de uma pequena alteração no peso relativo

renal (**p=0,0135). Diante destes resultados podemos inferir que EMAC pode ser bem tolerado por possuir baixa toxicidade frente aos parâmetros avaliados, porém para uma compreensão mais aprofundada de seus efeitos, estudos de caráter sub-crônicos e crônicos poderão melhor elucidar seus efeitos.

Descritores: Toxicidade aguda. *Amazonia campestris*. Extrato metanólico.

Abstract

The *Amazonia campestris* is a Lamiaceae family plant, popularly used as an aid in the treatment of diseases such as malaria and diabetes. But they are not reported in the scientific literature of toxicological studies to ensure safe administration of both species in nature, as in the form of vegetable drug or future herbal medicine. Therefore, the objective was to evaluate the acute toxicity of methanol extract of the roots of *Amazonia campestris* (EMAC) in rodents. The experiment took place with 12 male Wistar rats (*Rats norvegicus albinus*) males exposed to sharply EMAC (2000 mg/kg, v.o.). After administration of the doses were observed general signs of toxicity, weight gain, water and feed consumption to measure evidence of EMAC lethal action for 14 days after exposure. On the 15th day a sample of blood was collected for determination of haematological and biochemical parameters. Later the mice were euthanized for macroscopic analysis and calculation of the weight of the bodies. In animals exposed acutely to EMAC (2000 mg/kg, v.o.) there was no evidence deaths, behavioral changes, changes in the consumption of water and feed or changes in biochemical and hematological parameters evaluated in the control group. Macroscopic aspects and relative mass of the organs showed normal, the exception of a slight change in kidney relative weight (** p=0.0135). Given these results we can infer that EMAC can be well tolerated because it has low toxicity compared to the evaluated parameters, but for a

deeper understanding of its effects, character studies sub-chronic and chronic may further elucidate its effects.

Keywords: Acute toxicity. Amazonia campestris. Methanol extract.

Introdução

As plantas por milênios vêm sendo usadas para cura de enfermidades, porém os produtos extraídos de plantas compõem uma ampla quantidade de compostos orgânicos naturais, produtos do metabolismo primário e secundário, que podem causar resultados favoráveis ou prejudiciais sobre o organismo. Lembrando que dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias pelas quais é administrada, toda substância pode ser avaliada como tóxica.

A utilização de espécies vegetais, com a finalidade de tratamento de doenças e sintomas, remota ao momento em que o homem despertou para a consciência, e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para o seu próprio benefício^{1,2}.

O Brasil com sua extensa biodiversidade, associada a uma diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento associado ao uso de plantas medicinais, tendo o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Entre as plantas de uso popular para auxílio de tratamento de enfermidades como malária e diabetes está a *Amazonia campestris*, algumas plantas associadas a esses tratamentos são consideradas tóxicas, e apesar de seu uso por parte da população, não existe estudos toxicológicos que garantam sua administração segura. O uso inadequado de plantas medicinais pode gerar graves problemas à saúde, devido à presença nestes vegetais de constituintes tóxicos ao organismo humano. Portanto, o delineamento desta

pesquisa visar avaliar a toxicidade aguda do extrato de *A. campestris* garantindo a segurança de seu uso in natura, como droga vegetal ou como de futuro medicamento fitoterápico.

A. campestris é uma espécie frutífera, floresce e frutifica em todos os meses do ano, esta espécie habita no domínio amazônico em locais sombreados e bordas de florestas, em latossolos, e em ambientes savanoides; no cerrado, campo rupestre, e em áreas de transição entre caatinga e cerrado, próximo a córregos, sobre solos arenosos, pedregosos e arenopedregosos, sendo encontrada nos estados do Amapá, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás e países que fazem fronteiras com o Brasil como Venezuela, Guianas e Suriname, perene, de até um metro de altura e usada popularmente como auxiliar no tratamento da malária e do Diabetes. Pertence à família Lamiaceae, da qual 36 espécies já foram comprovadamente reconhecidas como detentora de atividade hipoglicemiante³⁻⁶.

Estudos de avaliação toxicológica da espécie *Amazonia campestris* não são relatados na literatura científica, o que torna necessária a realização desta pesquisa em função do difundido uso popular da espécie e do cumprimento de etapas para registro de um provável fitoterápico a base deste vegetal junto a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária⁽⁷⁾. Assim os testes farmacológicos e toxicológicos utilizando animais são considerados como etapa imprescindível da pesquisa de novos produtos destinados ao uso em humanos inclusive os medicamentos fitoterápicos⁸.

Uma vez que a segurança no uso de qualquer medicamento é condição sine qua non para viabilização de registro e comercialização. Esta pesquisa propôs avaliar a toxicidade aguda do extrato metanólico das raízes de *Amazonia campestris* (EMAC) em roedores para assim contribuir para o conhecimento científico de espécies amazônicas, fazendo-se conhecer melhor a rica biodiversidade alvo das atenções de pesquisadores e empresas do Brasil e do mundo.

Método

Material botânico

As raízes de *A campestris* foram coletadas no bairro de fazendinha, município de Macapá-AP. Uma exsicata foi preparada e depositada no HAMAB – Herbário Amapaense do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Amapá (IEPA) com nº 015418.

Preparação do extrato bruto

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 45°C e triturado em moinho de faca. Em seguida, foi submetido a processo de maceração em metanol durante 10 dias. A solução extrativa foi filtrada a vácuo e concentrada em rotaevaporador (45 rpm) a temperatura máxima de 60°C.

Logo após a rotaevaporação do EMAC, realizou-se o cálculo do rendimento geral do extrato. Obtendo o Rendimento geral de 1,756%. Utilizando a seguinte fórmula: **Re=(Peb/Prt)x100**. Sendo Re: o rendimento total do extrato (%); Peb: peso do extrato bruto (g); Prt: peso das raízes trituradas.

Toxicidade aguda

O protocolo experimental utilizado foi baseado na Resolução nº 90, de 16 de março de 2004 da ANVISA; esta resolução determina que a finalidade da toxicidade aguda é avaliar os efeitos tóxicos de uma substância teste após exposição a uma dose única ou fracionada administrada no período de 24 horas⁹. O projeto foi submetido ao comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (CEUA/UNIFAP) de acordo com o que preconiza a Resolução de nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, aprovado e protocolado com o número 01/2015.

Os animais, ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinos*) foram fornecidos pelo Biotério do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), Macapá, Ap. Os animais em idade adulta, para realização do ensaio estavam em jejum de 12 horas, pesando de 200 a 250g. Ao longo do

trabalho foram agrupados em gaiolas de polietileno (seis animais por gaiola) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($25\pm^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à comida e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno com bicos metálico. A ração e água são colocadas nas grades metálicas na parte superior da gaiola. Os animais mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas.

Foi administrado por via oral, gavagem, uma dose de 2000mg/kg do EMAC para cada um dos animais do grupo experimental, enquanto que o grupo controle recebeu apenas o veículo (NaCl 0,9% mais 0,5% twen 80) na mesma quantidade.

Após a administração do EMAC e veículo nos dois grupos, observou-se às possíveis alterações de comportamento, obedecendo aos seguintes tempos: 0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 240 minutos e diariamente durante 14 dias seguidos. Sendo avaliados os seguintes parâmetros no “Screening” hipocrático: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, aperto de cauda, contorção trem posterior, endireitamento e retirada (cauda), tônus muscular, força de agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, estimulações, Straub, hipnose, anestesia, lacrimação, ptose palpebral, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, urina vermelha e diarreia. Os parâmetros foram avaliados através de escalas analógicas unipolares variando de 0 a 4 (Anexo II). A partir da 24^a hora até 14 dias após a administração da dose, foi observado diariamente a variação de peso (g) dos animais, consumo de ração (g) e água (mL).

Para análise dos resultados do estudo de toxicidade aguda foi utilizado o programa Graph Pad Prism 5.03 utilizando o “t”studant e a análise de variância (ANOVA) e de uma classificação seguida do pós-teste de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de 95% ($p<0,05$) sendo os valores expressos em média \pm erro padrão da média.

Resultados

O EMAC (2000mg/kg) não induziu sinais de toxicidade como alterações comportamentais ou morte nos animais experimentais durante os 14 dias de observação, após a administração aguda.

Desenvolvimento ponderal dos animais

A análise da evolução ponderal dos animais tratados com EMAC (2000 mg/kg) foi avaliada comparando-se o ganho de peso diário destes com dos animais do grupo controle (que receberam apenas o veículo). Pode-se evidenciar que EMAC não promoveu alteração significativa no ganho de peso do grupo teste em relação aos animais do grupo controle conforme Figura 1.

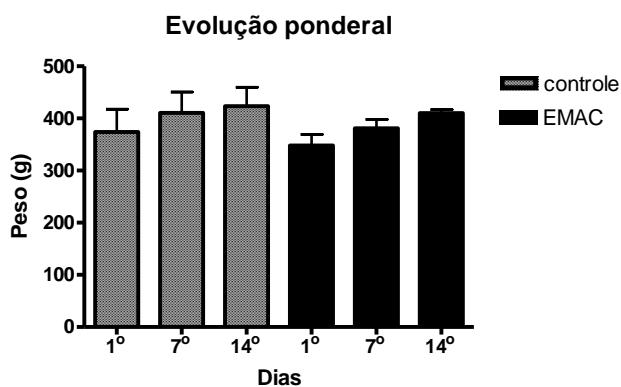


Figura 1- Efeito de EMAC (2000 mg/kg, v.o) sobre a evolução ponderal de ratos machos (n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com o grupo controle (n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. O teste utilizado para comparação entre médias foi o “t” student.

Consumo de ração

Conforme a Figura 2a. A dose de 2000 mg/kg do EMAC não foi capaz de induzir diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) quanto ao consumo de ração entre animais dos grupos testes e controles (que receberam apenas o veículo).

Consumo de água

A ingesta hídrica pelos animais que receberam o EMAC (2000 mg/kg) também não foi diferente estatisticamente ($p>0,05$) daquela do grupo controle (veículo), conforme demonstrado na Figura 2b.

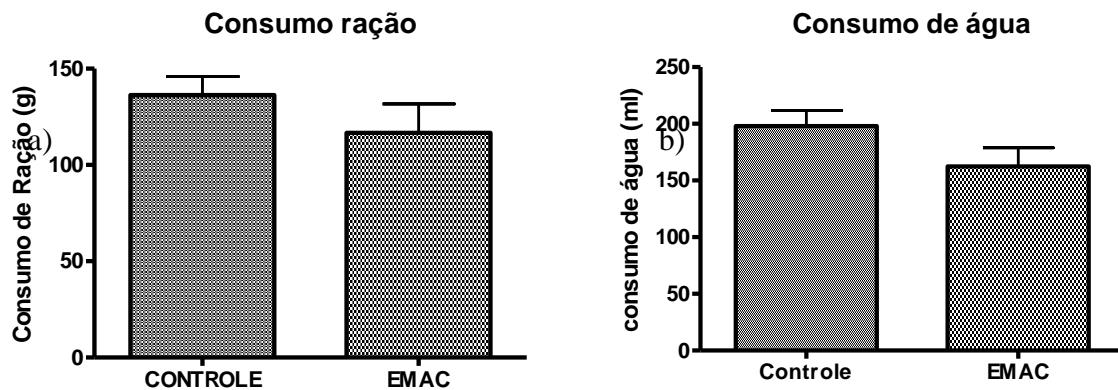


Figura 2- a) Efeito de EMAC (2000 mg/kg, v.o) sobre a média do consumo de ração por ratos (n=6), em quatorze dias de observação, quando comparados com o grupo controle (n=6-6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m. b) Efeito de EMAC (2000 mg/kg, v.o) sobre a consumo de água de ratos (n=6), quando comparados com o grupo controle (n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m.

Exame macroscópico e massa relativa (%) dos órgãos

No exame macroscópico de órgãos vitais (pulmões, fígado, coração e rins) dos animais tratados com EMAC (2000 mg/kg), não evidenciou-se alterações na estrutura, rigidez ou coloração das superfícies de tais órgãos quando comparados ao grupo controle, tratado apenas com o veículo. Porém, o extrato reduziu de forma estatisticamente significativa à massa relativa (%) dos rins (** $p=0,0135$) do grupo teste em relação ao grupo controle. Nenhuma alteração significativa foi evidenciada na massa relativa de coração, pulmão e fígado.

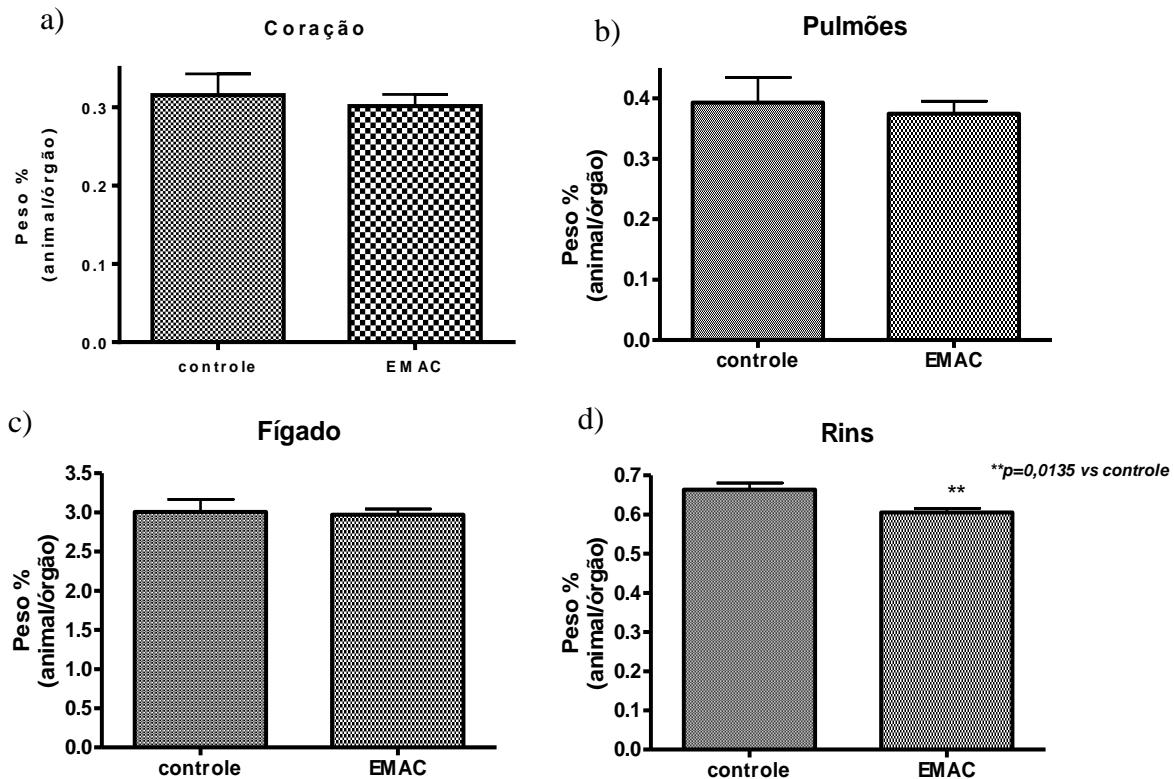


Figura 3. Efeito de EMAC (2000 mg/kg, v.o) sobre a massa relativa (%) do coração, pulmão, fígado e rins de ratos (n=6). Os resultados foram expressos como a média \pm e.p.m., sendo estas comparadas com as do grupo controle (n=6) utilizando o “t” Student.

Análise do perfil hematológico

A Tabela 1 nos mostra o resultado do hemograma realizado nos 12 ratos dos grupos controle e teste, após 14 dias da administração via oral do EMAC na dose de 2000 mg/kg.

Como pode ser observado na tabela abaixo os parâmetros hematológicos dos animais tratados com o extrato não apresentaram diferenças estatísticas significativas quando comparados com os do grupo que recebeu apenas o veículo (controle).

Tabela 1-Efeito da administração aguda de EMAC sob o perfil hematológico dos ratos quatorze dias após a exposição, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (média±epm), (“*t*”deStudent).

Parâmetros Hematológicos	Controle	EHVG (2g/kg)	Valor de “ <i>p</i> ”
Hemácias	4.45 ± 0.05	4.62 ± 0.28	0,3500
HT (%)	40.50 ± 0.50	42.50 ± 2.59	0,3179
HB (g/dL)	13,48±0,33	14,52±0,46	0,0961
GRANS	64.50 ± 0.50	63.75 ± 4.32	0,4568
CHCM	34.50 ± 0.50	34.50 ± 0.50	0,5000
PLT (µL)	745.5 ± 225.5	467.3 ± 94.73	0,1165
LEUC.	6.45 ± 0.05	6.37 ± 0.43	0,4568
EOS (%)	64.50 ± 0.50	63.75 ± 4.33	0,4568
SEGM (%)	2.637 ± 1.0	2.474±0.58	0,4433
LINF (%)	3.685 ± 1.0	3.774± 0.57	0,4689

Análise do perfil bioquímico

Conforme a tabela 2 a média dos valores bioquímicos sanguíneos absolutos dos ratos que receberam o EMAC na dose de 2000 m/kg (dose única, v.o) e o grupo controle que recebeu apenas o veículo. Os resultados obtidos demonstram que o EMAC não foi capaz de promover alterações com significância estatística para todos parâmetros analisados.

Tabela 2-Efeito da administração aguda de EMAC sob o perfil bioquímico de ratos, quatorze dias após a exposição, em comparação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (média±epm, (“*t*”deStudent)).

Parâmetros Bioquímicos	Controle	EHVG (2mg/kg)	Valor de “ <i>p</i> ”
Glicose (mg/dL)	111.6 ± 9.2	116.5 ± 13.8	0,3845
Colesterol (mg/dL)	58.6 ± 5.1	50.7 ± 6.4	0,1823
Triglicerídeos (mg/dL)	89.8 ± 4.1	85.7 ± 7.7	0,3193
Creatinina (mg/dL)	0.44 ± 0.02	0.42± 0.11	0,4432
Ácido úrico (mg/dL)	2.6 ± 0.4	2.9 ± 0.7	0,3548
Proteínas totais (g/dL)	6.7 ± 0.24	7.4 ± 0.52	0,1082
Fosfatase alcalina (UI/L)	75.00 ± 13.62	39.95 ± 19.73	0,0874
Bilirrubina total (mg/dL)	1.16± 0.37	1.42 ± 0.69	0,3653
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0.62 ± 0.37	0.20 ± 0.04	0,1779
Bilirrubina direta (mg/dL)	0.54 ± 0.21	1.22 ± 0.65	0,1540
G-GT (U/I)	6.4 ± 1.36	8.5 ± 2.22	0,2132
Transaminase	45.0 ± 11.2	27.5 ± 6.6	0,1258
sódio	142.0 ± 0.89	142.5 ± 1.19	0,3707
Potássio	5.74 ± 0.61	5.67 ± 0.67	0,4729

Discussão

Existe uma variedade de plantas que são usadas para o tratamento do diabetes que em estudos tem apresentado um determinado grau de toxicidade. Há muitos efeitos tóxicos das plantas, os quais podem resultar em hipoglicemia, tais como hepatotoxicidade e bloqueio β-adrenérgico⁶.

Algumas plantas associadas ao tratamento do diabetes e da malária são consideradas tóxicas. Portanto, apesar de seu uso, por parte da população, não existe estudos toxicológicos que garantam sua administração segura, lembrando que toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias pelas quais é administrada¹⁰.

Em estudo de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com o produto em teste ou, eventualmente, com doses parceladas em períodos não superior a 24 horas¹¹. A avaliação dos resultados imediatamente após esse período, permite conhecer a espécie mais sensível e o índice de letalidade; a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo; as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte; as alterações hematológica, da bioquímica plasmática e urinária, esses resultados mais o exame histopatológico indica as lesões dos órgãos afetados, e a manutenção de alguns animais tratados agudamente por 7 e 14 dias , consistiu em verificar os efeitos tardios do tratamento e se a recuperação da ação tóxica ocorre durante esse período de observação dos animais sobreviventes. O teste agudo é obrigatório para todos os tipos de materiais em teste, independentemente do tempo de uso proposto para espécie humana, pois evidencia o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las, além de oferecer suporte à escolha das doses para os demais testes de toxicidade¹².

Em um ensaio de toxicidade pré-clínica aguda os animais são tratados com dose única do produto em teste ou, eventualmente, com doses repetidas em período não superior a 24 horas¹³. No caso deste estudo, fez-se a utilização da dose única com o EMAC de 2000 mg/kg em ratos *Wistar*.

O estudo toxicológico pré-clínico agudo de uma droga é de fundamental importância, pois caracteriza os efeitos tóxicos produzidos a partir de sua administração, em uma

determinada concentração, capaz de provocar danos em órgãos de metabolização em animais de experimentação.

EMAC não promoveu morte nos animais testados, nem sinais visíveis de toxicidade, com alterações comportamentais, consumo de água e ração, coordenação motora, influencia no SNC (como tremores, convulsões, straub, hipnose, anestesia) ou no Sistema Nervoso Autônomo (como lacrimação, respiração, cianose, ptose, salivação, micção, piloereção, hipotermia)¹⁴.

Esses dados mostram que o extrato apresenta indícios de segurança na utilização, sendo portanto bem tolerado, pois indicam baixa toxicidade pelo uso da substância testada, uma vez que não foram registrados sinais de toxicidade geral, como a perda de peso e óbitos durante todo o período experimental, sugerindo o não envolvimento do SNC e SNA¹⁵. Durante os 14 dias também não foram observados sintomas de toxicidade sistêmica como: redução nos consumos de água e ração, alterações de comportamento, apatia e má condição da pelagem, como a presença de pelos arrepiados¹⁶.

Em relação à análise macroscópica e peso dos órgãos vitais (coração, pulmões, fígado e rins) o EMAC não se mostrou cardiotóxico, hepatotóxico ou tóxico para os pulmões, porém causou uma diminuição estatisticamente significativa na massa relativa (%) dos rins destes animais. Tal alteração pode estar associada a sinais de nefrotoxicidade¹³. Porém, modificações bioquímicas, que fizessem correlação com a diminuição relativa do órgão, não foram evidenciadas. A utilização de creatinina endógena “clearenc test” é o mais específico e sensível teste para avaliar a função renal, pois, ao contrário da ureia, seu nível não é afetado pela dieta, idade e sexo e geralmente se encontra aumentados na insuficiência renal. Níveis plasmáticos reduzidos de ureia e ácido úrico fornecem indícios de uma melhora da função renal, sugerindo o seu uso no tratamento da insuficiência renal aguda ou, ainda, pode indicar uma diminuição do catabolismo proteico¹⁷. No entanto, a elevação nos níveis plasmáticos de

ureia e creatinina fornece indícios de sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, de aumento no catabolismo proteico¹⁸.

Quanto ao estudo hematológico, todos os exames estão dentro dos parâmetros de referência para normalidade. A análise dos parâmetros sanguíneos é relevante para avaliar os riscos apresentados ao organismo pela utilização da substância. As mudanças nestes parâmetros demostram alto valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são convertidos a partir de estudos com animais¹⁹. Portanto, a *Amazonia campestris* pode ser considerada uma planta com baixa toxicidade, mas há a necessidade de teste de toxicidade crônica para avaliar melhor sua segurança para o consumo.

Conclusão

- Não ocorrência de mortes e modificações comportamentais, bem como ausência de alterações no consumo de ração e água;
- A falta de alterações com significância estatística para os parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados;
- Aspectos macroscópicos e massa relativa dos órgãos dentro da normalidade, a exceção de uma pequena alteração renal;
- O conjunto de dados obtidos sugere que o EMAC apresenta baixa toxicidade aguda.

Referências

1. Martins ER, Castro DM, Castellani D. Plantas medicinais. Universidade Federal de Viçosa, 1994.
2. Di Stasi LC. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos: Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESPE; 1996. p.109-129.

3. Moldenke HN. Notes on the genus *Amazonia* VIII. In: Gleasson HA, Moldenke HN. *Phytologia*. 1980; 47(2): 137-140.
4. Santos JS, França F, Silva MJ, Sales MF. Levantamento das espécies de *Amazonia* (Lamiaceae) para o Brasil. *Rodriguésia*, 2012; 63(4): 1101-1116.
5. Ramirez R. Biología reproductiva de *Amazonia campestris* (aubl.) Moldenke (verbenaceae) en los llanos Centrales de Venezuela. *Acta bot. Venez.*, 2007 30(1): 385-414.
6. Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas*. 2005; 41(2): 121-142.
7. Resolução RDC nº. 14 de 18 de junho de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União [periódico na *internet*]. 18 jun 2014. [citado 18 mar 2015] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>
8. Souza Brito ARM. Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo*. Campinas: Editora da Unicamp; 1995.
9. Resolução RE 90 de 16 de março de 2004 (BR). Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Diário Oficial da União [periódico na *internet*]. 18 mar 2004. [citado 18 mar 2015] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>
10. Oga S. Fundamentos de toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
11. Klaassen CD, Watkins JB. Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull (Lange). 2^a ed. São Paulo: Artmed, 2012.
12. Lapa AJ, Souccar CC, Lima-Landman, MTR, Godinho RO, Nogueira TCML. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: Simões CMO et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Editora: UFSC, 2007; p. 255

13. González FH, Silva SC. Introdução à Bioquímica Veterinária. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003; 198p.
14. Almeida MT, et al. Triagem Farmacológica de plantas do Nordeste Brasileiro. In: Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais. Paraíba. Anais, 1983. p 345-354.
15. Almeida RN, Quintans-Júnior LJ, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Araújo CC. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. Rev Bras Farm, 1999, 80: 72-76.
16. Mello FB. Estudo dos efeitos de *Lantana câmara* (*Verbenaceae*) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. Porto Alegre, 120p. [Dissertação de mestrado]. Rio Grande do Sul (RS). Programa de pós graduação em ciências veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.
17. Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani A, Ciomar, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. Acta Sci Health Sci. 2006;28(2): 165-70.
18. Costa JP, Lourenço NV, Santos CCMP, Tomé AR, Sousa GF, Sousa DP, et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2012;33(3):421-428.
19. Jesus NZT, Silva Júnior IF, Lima JCS, Colodel EM, Martins DTO. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2012; 22(6): 1308-1314.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato metanólico das raízes da *Amazonia campestris* no teste oral de tolerância a glicose apresentou uma satisfatória redução da glicemia no tempo 90 minutos. Dado que levou a uma investigação com ratos diabéticos induzidos por Aloxano, onde os resultados nas primeiras 6 horas de tratamento com a dose 400mg/kg de extrato e no 4º dia de tratamento também foram obtidos resultados satisfatórios. Durante os 6 dias de tratamento os animais que utilizaram o extrato e glibenclamida tiveram ganho ponderal e manutenção do peso. Ao final do tratamento os índices de colesterol do grupo com dose 400mg/kg estavam baixos. Portanto o extrato metanólico das raízes da *Amazonia campestris* possui efeito hipoglicemiante. Mas necessita de estudos mais complexos acerca de seu mecanismo de ação, e toxicidade.

Os estudos com plantas medicinais têm se tornado cada vez mais importante, pois no decorrer dos anos tem sido descoberta princípios ativos com atividades farmacológicas que apresentam ação melhor que dos medicamentos sintéticos, e que já eram usadas para esse fim a vários anos. O tratamento do Diabetes Mellitus só iniciou a partir de 1921 com a insulina por Benting e Best. Hoje além do tratamento da insulina temos os hipoglicemiantes orais sintéticos padronizados para o tratamento, e as plantas medicinais sendo utilizadas como terapia complementar, onde uma variedade de plantas vem apresentando atividade farmacológica igual ou melhor que os medicamentos padronizados. Dentre esta variedade de plantas encontramos a *Amazonia campstris* sendo utilizada com indicação popular para tratamento do Diabetes, mas que não havia nenhum estudo que comprovasse sua ação farmacológica ou toxica. Este estudo

É o primeiro de muitos que devem vir para respaldar o efeito hipoglicemiante desta planta, seu mecanismo de ação e sua segurança de uso através de testes toxicológicos mais completos.

REFERÊNCIAS

AGUILARA, F. J. A.; RAMOS, R. R.; GUTIERREZ, S. P.; CONTRERAS, A. A.; WEBER, C.C.C.; SAENZ, J. L. F. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **J Ethnopharmacol.** v. 61, n. 2, p. 101-10, 1998.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA (ANVISA). Resolução RDC nº. 14 de 18 de junho de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 jun. 2014. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em 16/03/2014.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITARIA (ANVISA). Resolução RE 90 de 16 de março de 2004 (BR). Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acessado em 16/12/2014.

ALMEIDA, M. T. Triagem Farmacológica de plantas do Nordeste Brasileiro. In: Simpósio Nacional de Farmacologia e Química de Produtos Naturais. Paraíba. **Anais**, 1983. p 345-354.

ALMEIDA, R. N.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; BARBOSA FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Rev Bras Farm.** v. 80, p. 72-76, 1999.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.34, n.1, p.S62-S69, 2011.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo***. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.

BILIC, N.; FELBER, J. P. Diabetogenic Action of Alloxan Following Temporary Interruption of Arterial Blood Flow to Pancreas in Rats. **Diabetes February**, v. 19, n. 2, p. 81-84. 1970.

BRAGA, A.; MEDEIROS, T. P.; ARAÚJO, B. V. Investigação da atividade antihiperglicemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis Sims*, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. **Rev. bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 2. 2010.

COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. C. M. P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; et al. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 421-428. 2012.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI, S.; BERSANI, A.; CIOMAR, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci Health**, v. 28, n. 2, p. 165-70. 2006

DORNAS, W. C.; NAGEN, T. J; OLIVEIRA, T. T.; CONTELLI, R. Aloxano e Diabetes, **Rev. Bras. de Toxic**, v. 19, n.2, p. 81-87. 2006.

DI STASI, L. C. **Química de produtos naturais: principais constituintes ativos: Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar.** São Paulo: UNESPE. 1996. p.109-129.

FERREIRA, C. L. R. A.; FERREIRA, M. G. Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde – análise a partir do sistema HiperDia, **Arq. Bras. Endocrinol. metab.** v.53, n. 1, p. 80-86. 2009

JESUS, N. Z. T.; SILVA JÚNIOR, I. F.; LIMA, J. C. S.; COLODEL, E. M.; MARTINS, D. T. O. Hippocratic screening and subchronic oral toxicity assessments of the methanol extract of *Vatairea macrocarpa* heartwood in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1308-1314. 2012

JENNISCHE, E.; HANSON, H. Á. Relation between alloxan-induced plasma membrane dysfunction inhibition of insulin secretion in pancreatic B-cells in vivo. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v. 94, p. 153-158. 1986.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull (Lange).** 2^a ed. São Paulo: Artmed, 2012.

LACERDA, A. M.; MODOLLO, A. K.; MATIAS, R. C.; PISTORI, H.; YANO, M.; ROEL, A. R.; et al. Screening of plants with potential phototoxic. **Brazilian Journal of pharmacy**, v.92, n.4, p. 352-355. 2011.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. C.; LANDMAN, M. T. R. L.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA T. C. M. L. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES C.M.O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Santa Catarina: UFSC, 2007, p. 255

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial, **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LEMOS, M.; RAMOS, Y.; D' ARMAS, A. L. H. Efecto Hipoglicemiant del Extracto de *Philanthus niruri* (Euphorbiaceae), en ratas diabéticas. **FCV-LUZ**, v. 23, n. 1, p. 11-18. 2013

LOPES, W. B. et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico**, 2002 Disponível em: <<http://www.prop.ufu.br/revistaelectronica/index.html>>. Acesso em 21/03/2004, 14:30.

LIMA, C. N.; MEDEIROS, A. A. N.; OLIVEIRA, G. R.; MEDEIROS, F. A. estudo da toxicidade do extrato metanólico das cascas do caule de *Licania Macrophylla* bent. Sobre *Artemia Salina*, **Revista Pesquisa e Iniciação Científica – Amapá**, v. 1, p. 07, 2008.

LINO, C. D.; DIOGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A. P. G.; NETO, M. A.; ALVES, R. S.; et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forticata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 125-127. 2004.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl. 01, p. 45-47, 2005.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. **Plantas medicinais**. Universidade Federal de Viçosa. 1994.

MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de *Lantana câmara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Rio Grande do Sul (RS). Programa de pós graduação em ciências veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MOHAMMADI, J.; NAIK, R. Evaluation of hypoglycemic effect of *Morus alba* in an animal model. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 40, n. 1), p. 15-18. 2008.

MOLDENKE, H. N. A monograph of the genus *Amazonia* L. **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**. v.46, n. 25, p. 193-228, 1939.

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* I. In: H. A. Gleasson & H. N. Moldenke. **Phytologia**, v. 2, n. 6, p. 198-200, 1946

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* II. In: GLEASSON, H. A.; MOLDENKE, H. N. **Phytologia**, v. 2, n. 7, p. 246-247, 1947.

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* III. In: GLEASSON, H. A.; MOLDENKE, H. N. **Phytologia**, v. 2, n. 11, p. 502, 1944.

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* IV. In: GLEASSON, H. A.; MOLDENKE, H. N. **Phytologia**, v. 4, n. 7, p. 452-456, 1953.

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* V. In: GLEASSON, H. A.; MOLDENKE, H. N. **Phytologia**, v. 7, n. 6, p. 338-342, 1961.

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* VII. In: GLEASSON, H. A.; MOLDENKE, H. N. **Phytologia**, v. 40, n. 5, p. 403-406, 1978.

MOLDENKE, H. N. Notes on the genus *Amazonia* VIII. In: GLEASSON, H. A.; MOLDENKE, H. N. **Phytologia**, v. 47, n. 2, p. 137-140, 1980.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

RAMIREZ, R. Biología reproductiva de *Amazonia campestris* (aubl.) Moldenke (verbenaceae) en los llanos Centrales de Venezuela. **Acta bot. Venez.**, v. 30, n. 1, p. 385-414. 2007.

RANG, H. P. et al. **Farmacología**. 6. ed. Esevier, 2007.

SANTOS, J. S.; FRANÇA, F.; SILVA, M. J.; SALES, M. F. Levantamento das espécies de *Amazonia* (Lamiaceae) para o Brasil, **Rodriguésia**. v.63, n 4, p. 1101-1116, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diagnóstico e Tratamento do Diabetes Tipo 1. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012.

SOUZA, V. H.; BARBOSA, A. P. O.; CARDOSO, G. C.; MARRETO, R. N.; BARRETO-FILHO, J. A. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Avaliação do Potencial Antidiabético de Cinco Plantas Medicinais em Ratos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.28(4), p.609-612, 2009.

SOUZA BRITO; A.R.M. **Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo***. Campinas: Editora da Unicamp. 1995.

SILVA, J. P. A.; SAMPAIO, L. S.; OLIVEIRA, L. S.; REIS, L. A. Plantas Medicinais Utilizadas por Portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2 para Provável Controle Glicêmico no Município de Jequié-Ba, **Revista Saúde Comunitária**, v. 4, n. 1, p. 10-18. 2008.

SIVARAJ, A.; DEVI, K.; PALANI, S.; KUMAR, P. V.; KUMAR, B. S.; DAVID, E. Anti-hyperglycemic and Anti-hyperlipidemic effect of combined plant extract of *Cassia auriculata* and *Aegle marmelos* in streptozotocin (STZ) induced diabetic albino rats. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1010-1016. 2009.

YADAV, J. P.; SAINI, S.; KALIA, A. N.; DANGI, A. S. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of ethanolic extract of *Salvadora oleoides* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 23-27. 2008.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDEROM, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes Mellitus, Botucatu, **Revista Brasileira de Planta Medicinal**, v. 4, n. 2, p. 35-45. 2002.

ANEXO 1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
COMITÉ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP**

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 25 de fevereiro de 2015, o parecer referente ao protocolo no. **001/2015** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes *Amazonia campestris***" coordenado por **Benedito de Souza Guimarães Júnior**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 25 February 2015, the final decision about the Protocol **001/2015** and certify that the research project entitled "**Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato metanólico das raízes *Amazonia campestris***" coordinated by **Benedito de Souza Guimarães Júnior**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 05 de março de 2015

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
 Presidente CEUA-UNIFAP
 Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
 Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
 Rod. Juscelino Juscelino Kubitscheck, km 02 – Campus Marco Zero,
 Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
 Fone (96)4009-2907

ANEXO 2**TOXICIDADE AGUDA – TABULAÇÃO DOS DADOS**

Atividade farmac.	Quantificação dos efeitos: (0) sem, (-) diminuído, (+) presente, (++) intenso																							
	Tempo: 15' 30' 1h 2h 4h						Tempo: 15' 30' 1h 2h 4h						Tempo: 15' 30' 1h 2h 4h											
DOSE CAIXA Nº de animais	Machos						Fêmeas						Machos						Fêmeas					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Peso																								
Atividade geral																								
Frêmito vocal																								
Irritabilidade																								
Resposta ao toque																								
Aperto de cauda																								
Contorção																								
Trem posterior																								
Endireitamento																								
Tônus corporal																								
Força de agarrar																								
Ataxia																								
Reflexo auricular																								
Reflexo corneal																								
Tremores																								
Convulsões																								
Estimulações																								
Straub																								
Hipnose																								
Anestesia																								
Lacrimação																								
Ptoses																								
Micção																								
Defecção																								
Piloereção																								
Hipotermia																								
Respiração																								
Cianose																								
Nº de mortos																								

Investigador: _____ Data: _____

Tempo de observação: _____ Amostra: _____ Via: _____