



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

BENEDITO JÚNIOR LIMA DE MEDEIROS

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Calophyllum
brasiliense* CAMBESS.: ATIVIDADES HIPOGLICEMIANTE E TOXIDADE

MACAPÁ

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.321

M488e MEDEIROS, Benedito Júnior Lima de.

Estudo pré-clínico do Extrato Hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense* Cambess.: atividades hipoglicemiante e toxidade/ Benedito Júnior Lima de Medeiros-- Macapá, 2014.

102 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Ensaios Biológicos.

Orientador: José Carlos Tavares Carvalho.

1. Diabete Mellitus. 2. Extratos vegetais. 3. Plantas medicinais – Toxicologia. 4. Toxidade. 6. Aloxano. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orient. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

BENEDITO JÚNIOR LIMA DE MEDEIROS

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Calophyllum
brasiliense* CAMBESS.: ATIVIDADES HIPOGLICEMIANTE E TOXIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração ensaios biológicos.

Orientador: Prof^o Dr. José Carlos Tavares Carvalho.

MACAPÁ

2014

BENEDITO JÚNIOR LIMA DE MEDEIROS

ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Calophyllum*
brasiliense CAMBESS.: ATIVIDADES HIPOGLICEMIANTE E TOXIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração ensaios biológicos.
Orientador: Profº Dr. José Carlos Tavares Carvalho.

DATA DE APROVAÇÃO: ____ / ____ / ____

Profº Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Universidade Federal do Amapá

Profº Dr. Caio Pinho Fernandes
Universidade Federal do Amapá

Profª Dra. Ana Rita Pinheiro Barcessat
Universidade Federal do Amapá

Profª Dra. Deyse de Souza Dantas
Universidade Federal do Amapá

MACAPÁ

2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Benedito Barbosa de Medeiros e Maria do Socorro Lima de Medeiros.

Aos meus irmãos, Benedito Bruno Lima de Medeiros e Maria Madalena Lima Muniz.

Ao meu grande orientador e amigo Profº José Carlos Tavares Carvalho.

Aos meus familiares e amigos (a).

AGRADECIMENTOS

Pelo fato deste trabalho significar todo o esforço e desempenho durante, não apenas dois, mais os sete anos que permaneci nesta universidade, gostaria de agradecer:

Á Deus, por me fortalecer nos momentos mais difíceis pelos quais passei, me dando perseverança para seguir a caminhada e chegar até o final deste curso.

A meus queridos pais, Benedito Medeiros e Socorro Medeiros, por terem dedicado grande parte de suas vidas às minhas realizações, e ainda, pelo valioso apoio em todos os momentos e incentivos em todas as escolhas.

Ao meu irmão, Benedito Bruno, que esteve ao meu lado e muito contribuiu para minha vitória.

A minha avó, Francisca do Nascimento, as minhas tias e primos pelo apoio, compreensão e paciência nos momentos em que estive ausente.

Ao meu grande amigo e pai científico Profº Dr. José Carlos Tavares, o qual me orientou na iniciação científica e durante toda a minha vida acadêmica. Obrigado pelo incentivo, paciência, dedicação e amizade a mim depositada, e por me ajudar a descobrir o significado e o valor da ciência e da pesquisa.

Aos meus primeiros orientados de Iniciação Científica Júnior, Wendel Leonardo Fernandes e Junior Silva Cardoso que, mesmo cursando o ensino médio me deram a oportunidade de vivenciar a experiência como orientador, me auxiliando em cada momento deste trabalho.

A equipe que contribuiu para que este trabalho fosse realizado: Helisson Oliveira Carvalho, Jonatas Lobato Duarte, Adriana Maciel, Orlando Silva Sousa, Beatriz Sá, Clarissa Lima, Mayara Tânia Pinheiro, Alexandro Florentino e a todos os amigos e colegas do Grupo de Pesquisa em Fármacos, pelo companheirismo, momentos de convivência, de troca de conhecimentos e de solidariedade, que me fizeram crescer enquanto ser humano e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, em especial a Léa Ayres, pelo auxílio e colaboração.

Aos funcionários da Universidade Federal do Amapá pela atenção e colaboração a mim dispensada durante as atividades.

As agências de fomento CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

A minha eterna gratidão a todos que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

EPIGRAFE

**“Todas as substâncias são venenos; não existe uma que não o seja.
A dose correta diferencia um veneno de um medicamento”**

Paracelsus (1493-1541)

RESUMO

Diabetes Mellitus é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante da deficiência na produção ou na ação da insulina no organismo. Entretanto, muitos medicamentos utilizados no controle dessa doença causam vários efeitos adversos e colaterais indesejáveis, prejudicando assim a adesão ao tratamento. Neste contexto, cresce a utilização popular de plantas com potencial terapêutico, as quais vêm sendo utilizadas cada vez mais como tratamento alternativo para inúmeras enfermidades, incluindo o diabetes. Portanto, este estudo buscou avaliar a atividade hipoglicemiante e a toxicidade do Extrato Bruto Hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (EBHECb) em ratos e camundongos. Para determinação da toxicidade aguda, utilizaram-se diferentes doses do EBHECb (500, 1000 e 2000 mg/kg, v.o, dose única) por um período de 14 dias, enquanto que na toxicidade sub-aguda administrou-se diariamente 500 mg/kg (v.o.) do EBHECb por um período de 30 dias. A indução do diabetes foi realizada por aloxano (42 mg/kg, e.v.) sendo administrado uma dose diária (500 mg/kg, v.o) de EBHECb por 30 dias, no qual avaliaram-se os parâmetros clínicos e laboratoriais dos animais tratados e seus respectivos controles ao final de cada atividade. Em relação a toxicidade, os animais não apresentaram nenhum sinal significativo que caracterizasse um possível efeito tóxico do extrato, quando avaliados os sinais comportamentais e clínicos, percentual de morte, desenvolvimento ponderal, ingestão hídrica, consumo de ração, análise bioquímica e hematológica. Em relação a atividade hipoglicemiante, os animais apresentaram sinais clínicos e laboratoriais compatíveis com o diabetes. O grupo tratado com o EBHECb apresentou diminuição no consumo de ração, estatisticamente significativa ($p < 0,01$, teste Tukey) a partir do 10º dia, com manutenção do peso, apresentando entre o 15º e o 30º dia diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle. Em relação à ingestão hídrica, os animais tratados com EBHECb e Insulina reduziram consideravelmente o consumo de água após os seus respectivos tratamentos, apresentando resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$). O grupo tratado com EBHECb apresentou também redução de 34,57% de excreção de urina e média de $595,08 \pm 26$ mg/dL ($p < 0,001$) de glicosúria, com redução de aproximadamente 20% em relação ao grupo controle. Em relação a glicemia, o grupo tratado com EBHECb obteve redução de 18% nos níveis glicêmicos, apresentando significância estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) em relação ao grupo controle. Portanto, o presente estudo sugere que o EBHECb é um produto promissor para utilização por via oral, apresentando baixa toxicidade e boa atividade hipoglicemiante, necessitando de estudos que possam comprovar seus mecanismos de ação.

Palavras chave: Extratos Vegetais. Diabetes Mellitus Experimental. Hipoglicemiantes. Aloxano. Toxicologia.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a metabolic syndrome characterized by hyperglycemia resulting from a deficit in production or action of insulin in the body. However, many drugs used in controlling this disease cause various adverse and side effects, impairing adherence to treatment. On this context, there is growing popular use of plants with therapeutic potential, which have been used increasingly as an alternative treatment for many diseases, including diabetes. Therefore, this study aimed to evaluate the hypoglycemic activity and toxicity of the Hydroethanolic Extract of *Calophyllum brasiliense* Gross Cambess (EBHECb) in rats and mice. Activities toxicity were determined using different doses of EBHECb (500, 1000 and 2000 mg/kg, p.o., single dose) for a period of 14 days, whereas in sub- acute toxicity were administered daily to 500 mg/kg (v.o.) of EBHECb for a period of 30 days. The induction of diabetes was performed by alloxan (42 mg/kg, i.v.) being administered a daily dose (500 mg/kg, p.o.) of EBHECb for 30 days, in which we assessed the clinical and laboratory parameters of the treated animals and their respective controls at the end of each activity. Regarding toxicity, animals showed no significant sign that featured a possible toxic effect of the extract when evaluated the behavioral and clinical signs, percentage of death, weight gain, water intake, food intake, biochemical and hematological analysis. Regarding the hypoglycemic activity, the animals showed clinical and laboratory signs consistent with diabetes. The group treated with EBHECb showed a decrease in feed intake, statistically significant ($p < 0.01$, Tukey test) from day 10, with weight maintenance, presenting statistically significant difference ($p < 0.001$) between the 15th and 30th day, when compared to the control group. Regarding the water intake, animals treated with insulin and EBHECb considerably reduced water consumption after their respective treatments, with statistically significant results ($p < 0.001$). The group treated with EBHECb also declined by 34.57 % urine excretion and glycosuria of 595.08 ± 26 mg/dL ($p < 0.001$), which represented a reduction of approximately 20 % when compared to control group. Compared to glucose, the group treated with EBHECb got 18% reduction in blood glucose levels, statistical significance ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) when compared to control group. Therefore, the present study suggests that EBHECb is a promising product for oral use, has low toxicity and good hypoglycemic activity, requiring studies to prove their mechanisms of action.

Key words: Plant Extracts. Diabetes Mellitus, Experimental. Hypoglycemic Agents. Alloxan. Toxicology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito do tratamento diário por via oral com EBHACb (500 mg/kg) sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratos machos e fêmeas no período de 30 dias. O grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal) 49
- Figura 2.** Efeito do tratamento diário por via oral com EBHACb (500 mg/kg) sobre o consumo hídrico (mL) de ratos machos e fêmeas no período de 30 dias. O grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal) 50
- Figura 3.** Efeito do tratamento diário por via oral com EBHACb (500 mg/kg) sobre o consumo de ração (g) de ratos machos e fêmeas no período de 30 dias. O grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal) 51
- Figura 4.** Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o consumo de ração (g) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias..... 60
- Figura 5.** Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o desenvolvimento ponderal (g) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias..... 62
- Figura 6.** Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o consumo hídrico (mL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias..... 63

Figura 7.	Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o volume urinário (mL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias.....	64
Figura 8.	Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre a glicosúria (mg/dL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias.....	65
Figura 9.	Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre a glicemia (mg/dL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Efeito da administração do EBHACb por via oral sobre o desenvolvimento ponderal (g) de camundongos machos e fêmeas tratados no período de 14 dias.....	48
Tabela 2.	Efeito da administração diária do EBHACb por via oral sobre os parâmetros bioquímicos realizados com o sangue dos ratos machos e fêmeas tratados por um período de 30 dias.....	52
Tabela 3.	Efeito da administração diária do EBHACb por via oral sobre os parâmetros hematológicos realizados com o sangue dos ratos machos e fêmeas tratados por um período de 30 dias.....	53
Tabela 4.	Peso absoluto (g) e relativo (%) dos órgãos dos ratos machos e fêmeas tratados por um período de 30 dias com EBHECb por via oral.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcento
ABNT	Associação Brasileira de Normas e Técnicas
ADA	American Diabetes Association
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATPase	Adenosina trifosfato sintase
CFF	Conselho Federal de Farmácia
cm	Centímetro (s)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCM2	Diclorometano
DL₅₀	Dose letal média
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EBHECb	Extrato Bruto Hidroetanólico de Calophyllum brasiliense
FA	Fosfatase alcalina
FDA	Food Drug Administration
g	Grama (s)
Gama GT	Gama-glutamyltranspeptidase
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobinas totais
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDF	International Diabetes Federation
kg	Quilograma (s)
Km	Quilômetros
LTDA	Limitada
m	Metro (s)
MCH	Hemoglobina corpuscular média
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume corpuscular médio
mg/dL	Miligrama (s) por decilitro

mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM/l	Milimol
MPV	Volume principal de plaquetas
n	Número amostral
NHVM	Núcleo hipotalâmico ventro-medial
nº	Número
NPY	Neuropeptídio Y
°C	Graus Celsius
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade, nível de significância
PDW	Largura da distribuição de plaquetas
PLT	Contagem de plaquetas
RBC	Hemácias totais
RDW	Largura da distribuição de células vermelhas
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécie Reativa de Oxigênio
s/n	Sem número
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
UI	Unidades Internacionais
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
v.o.	Via oral
WBC	Leucócitos totais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Diabetes Mellitus e sua ocorrência no contexto global	20
2.2	As plantas medicinais e seu uso popular	23
2.2.1	Os efeitos tóxicos das plantas medicinais	25
2.3	A fitoterapia como tratamento alternativo e complementar	28
2.3.1	Os fitoterápicos e o Diabetes Mellitus	29
2.3.2	Modelos experimentais de Diabetes Mellitus	31
2.4	A espécie <i>Calophyllum brasiliense</i>	34
2.4.1	Aspectos químicos	36
2.4.2	Aspectos farmacológicos	37
3	METODOLOGIA	40
3.1	Caracterização do estudo	40
3.2	Obtenção do material vegetal	40
3.3	Descrição dos animais	41
3.4	Avaliação da toxicidade	42
3.4.1	Determinação da dose letal média e teste toxicológico agudo	42
3.4.2	Avaliação da toxicidade sub-aguda	43
3.5	Avaliação da atividade hipoglicemiante	44
3.5.1	Avaliação clínica e laboratorial	45
3.6	Análise estatística	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	94
	APÊNDICES	95

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, vivenciada nos dias atuais, tem-se observado um crescimento na incidência de doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas, o Diabetes Mellitus-DM.

O DM é uma síndrome que interfere diretamente no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas, resultante da deficiência na produção de insulina pelo pâncreas ou pela redução da sensibilidade dos tecidos a mesma. Esta pode ser evidenciada através de sintomas como hiperglicemia, glicosúria, poliúria, polifagia, polidipsia, dentre outros.

Sua incidência e prevalência em todo o mundo são alarmantes. Isso se deve, além das características metabólicas já citadas, a fatores genéticos, nutricionais e a estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade.

O DM pode ser classificado, basicamente, em três tipos. Além de suas diferenças na sintomatologia e tratamento, eles se diferenciam pela característica da população acometida, sendo que o DM tipo 1 geralmente ocorre em crianças e adolescentes, o tipo 2 atinge principalmente a população entre 30 e 69 anos, e o DM gestacional que atinge mulheres no período da gravidez.

Entretanto, pode-se evidenciar, atualmente, a presença de DM tipo 2 também em crianças, devido à obesidade e ao sedentarismo infantil, os quais estão diretamente relacionados a práticas de estilos de vida inadequados.

O DM é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, levando em consideração tanto o número de pessoas afetadas quanto o índice de incapacitação e mortalidade, bem como os custos envolvidos em seu tratamento.

A Sociedade Brasileira de Diabetes-SBD (2006) destaca que cerca de 194 milhões de pessoas no mundo possuem DM, sendo que aproximadamente 50% destas pessoas desconhecem sua condição de portador da patologia, o que torna esse grupo mais suscetível a complicações inesperadas.

Segundo Wild (2004) há uma grande probabilidade da quantidade de pessoas com diabetes aumentar, podendo até duplicar essa estimativa até o ano de 2030. No Brasil são cerca de seis milhões de pessoas com DM, sendo

responsável por 4 milhões de mortes por ano, representando 9% da mortalidade total mundial (SBD, 2006).

Diante dessa realidade, faz-se necessário a busca de alternativas que venham contribuir para o tratamento do DM, diminuindo assim os índices de morbidade e mortalidade dessa doença.

Mesmo com o avanço tecnológico e estudos inovadores, ainda não se obteve a cura para o DM, havendo apenas medicamentos que auxiliam no controle de sinais e sintomas apresentados pela doença. Esses medicamentos, porém, promovem muitos efeitos colaterais e adversos, dificultando assim a adesão das pessoas com DM ao tratamento adequado.

Portanto, torna-se frequente a procura por tratamentos alternativos que possam auxiliar no controle dos sinais e sintomas apresentados pelo diabetes. Dentre os tratamentos alternativos utilizados pela população, o mais comum é a utilização de plantas medicinais.

Embora a área da saúde moderna esteja se desenvolvendo na maioria do mundo, grande parte da população mundial, em especial dos países em desenvolvimento, depende do saber tradicional para sua atenção primária, utilizando-se principalmente das plantas medicinais ou de suas preparações.

Além disso, estudos diversos são realizados por grupos de pesquisas nacionais e internacionais com o objetivo de desvendar novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas, sendo este fator primordial para a descoberta de muitas drogas.

Assim, a fitoterapia é um método utilizado por muitas pessoas, principalmente da região amazônica, como uma fonte de fácil aquisição e baixo custo no tratamento de várias enfermidades, dentre elas o DM.

Os pacientes portadores do DM buscam através das plantas medicinais e dos fitoterápicos tratamentos alternativos que visam minimizar as complicações ocasionadas pela doença e evitar os efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos sintéticos disponíveis atualmente.

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática antiga. Entretanto, estima-se que a maioria das plantas utilizadas na medicina popular ainda não possuem comprovação científica relacionada aos seus componentes químicos, ações farmacológicas e suas reais indicações.

Apesar de suas propriedades terapêuticas, das quais muitas ainda são desconhecidas pela comunidade científica, as plantas medicinais podem causar efeitos tóxicos que podem levar a graves danos à saúde se utilizadas de maneira inadequada.

Assim, observa-se que, mesmo com a revolução técnico-científica vivenciada atualmente, estes não são suficientes para eliminar a presença de crenças e práticas populares vinculadas a tradições que são passadas entre gerações.

Pode-se dizer que, no Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está arraigada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus. Por muito tempo tal procedimento representou a principal forma de cura, especialmente entre a população rural.

De acordo com o cenário nacional, no que se refere ao uso de plantas medicinais no cuidado com a saúde humana, a região norte do país se destaca por possuir uma ampla biodiversidade, tendo em vista sua inserção na região amazônica, a qual possui um banco biológico diversificado e específico desta localidade.

No estado do Amapá, o uso das plantas medicinais sempre foi prática costumeira da maioria da população, em especial nos municípios do interior do estado, nos quais a assistência a saúde é precária.

Dentre os grupos de plantas utilizadas para amenizar os diversos sinais e sintomas, assim como a cura de diversas doenças, destacam-se as hipoglicemiantes, as quais são utilizadas como coadjuvantes no tratamento da DM.

No Brasil, existem muitas plantas com ação hipoglicemiantes oferecendo, assim, potencial para a pesquisa científica com o objetivo de validar o seu uso com eficácia e segurança. Atualmente, estudos sobre novas drogas hipoglicemiantes vêm sendo realizado, com enfoque especial nas plantas utilizadas na medicina popular.

Muitas são as espécies vegetais utilizadas pela população como tratamento terapêutico alternativo para o controle do DM, dentre as quais se encontra a espécie vegetal *Calophyllum brasiliense* Cambess., popularmente conhecida como jacareúba.

Assim, a *Calophyllum brasiliense* é uma das mais variadas espécies de plantas utilizadas pela população para auxiliar no controle dos sinais e sintomas do DM, principalmente referentes à hiperglicemia.

Esta espécie pode ser encontrada de forma espontânea em toda a América Latina, havendo uma maior predominância da espécie em regiões como a Amazônia e a Mata Atlântica.

A árvore é muito utilizada pela indústria madeireira para a confecção de móveis e madeira, assim como para a confecção de papel. Na medicina popular é utilizada no tratamento de diversas doenças gastrintestinais, respiratórias, inflamatórias e doenças crônicas não transmissíveis, como a hipertensão e o diabetes.

Diversos estudos, muitos citados no decorrer deste trabalho, têm sido realizados com o objetivo de comprovar suas ações terapêuticas. Seus efeitos farmacológicos estão sendo atribuídos aos mais diversos tipos de compostos químicos, existentes nessa espécie, os quais possuem bioatividade em um organismo vivo.

Entretanto, faz-se necessário a realização de investigações que possam comprovar suas atividades farmacológicas e toxicológicas, para que se possa fazer uso de suas propriedades terapêuticas sem risco de comprometimento à saúde.

Neste sentido, a proposta deste estudo foi avaliar a atividade tóxica e hipoglicêmica do Extrato Bruto Hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense* (EBHECb) em modelos *in vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Diabetes Mellitus e sua ocorrência no contexto global

O Diabetes Mellitus–DM é definido como uma disfunção crônica que ocorre no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios, sendo caracterizado, principalmente, pelo alto índice de açúcar no sangue (hiperglicemia) e pela presença de açúcar na urina (glicosúria), resultante da falta de insulina ou incapacidade desta em exercer adequadamente seus efeitos nos tecidos alvos (BRASIL, 2001; LIMA, 2004).

O aspecto característico do DM é a hiperglicemia, que se constitui em reflexo da deterioração na utilização dos carboidratos (glicose) em virtude de resposta defeituosa ou deficiente à secreção de insulina (NEGRI, 2005).

O mecanismos homeostáticos mantêm os níveis de glicose sanguínea dentro de uma faixa estreita de 4,5- 5,5 mM/l. Este controle é realizado por modulação hormonal, sendo, basicamente, dois os hormônios reguladores: glucagon que é o hormônio responsável pelo estímulo da gliconeogênese pelo fígado nos períodos de jejum e a insulina, o hormônio que estimula a captação e a utilização da glicose pelos músculos esqueléticos, músculo cardíaco e adipócitos, após a ingestão de alimentos ricos em carboidratos (ROCHA et al., 2006).

As células do pâncreas ou Ilhotas de Langerhans são responsáveis por produzir os hormônios peptídeos glucagon, insulina e somatostatina. A insulina é armazenada e secretada pelas células beta, o glucagon pelas células alfa e a somatostatina pelas células delta, todas localizadas nas Ilhotas de Langerhans (LEHNIGER; NELSON; COX, 2007).

Segundo Guyton e Hall (2008) quando a homeostase do metabolismo dos carboidratos e lipídeos encontra-se desregulada, significa que a insulina não está atuando corretamente. A consequência da atuação inadequada de insulina é o aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea.

A hiperglicemia crônica, presente no diabetes, está associada ao período de exposição da pessoa à doença, ocasionando danos a diversos órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (American Diabetes Association–ADA (ADA, 2011).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes–SBD (2006), o DM pode ser classificado em dois tipos: o tipo 1 onde ocorre ausência ou diminuição da secreção da insulina pelas células beta das Ilhotas de Langerhans do

pâncreas, ocasionadas por fatores hereditários, destruição das células beta por auto-anticorpos ou ainda por destruição viral, e o tipo 2 que resulta de graus variados de resistência a insulina e da deficiência relativa de secreção de insulina pelo pâncreas.

Segundo a ADA (2011), há também outros tipos de DM, decorrentes de defeitos genéticos associados com outras doenças ou com uso de fármacos diabetogênicos, além do DM gestacional, a qual se caracteriza pela diminuição da tolerância à glicose, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto.

A SBD (2006) considera que fator de risco significa maior chance de desenvolver a doença. Sendo assim, os fatores de risco que levam a pessoa desenvolver o DM podem estar relacionados ao histórico familiar de diabetes, raça/etnia, idade acima de 45 anos, hipertensão, colesterol, história de diabetes gestacional, assim como estilos de vida inadequados, que podem levar ao sobrepeso e sedentarismo (SMELTZER; BARE, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde–OMS (2004), a cada ano 3,2 milhões de mortes são atribuídas ao diabetes. Assim, pode-se dizer que o diabetes se tornou uma pandemia, pois pesquisas afirmam que mais de 194 milhões de pessoas possuem diabetes no mundo, sendo que 50% destas pessoas desconhecem sua condição de portador dessa patologia, tornando esse grupo mais suscetível a complicações inesperadas. Além disso, há perspectivas de que essa quantidade irá dobrar até o ano de 2025 (SBD, 2006; NEGRI, 2005).

Em relação às américas, estudos realizados por Sartorelli e Franco (2003) estimam que no ano de 2025 serão 64 milhões de pessoas com diabetes. Sendo que pesquisas já apontam que o Brasil ocupa o oitavo lugar na escala mundial de pessoas com DM do tipo 2, com aproximadamente 6,2 milhões de diabéticos, e estima-se que para o ano de 2025, este número alcance 12 milhões de pessoas com DM (BRASIL, 2001).

No âmbito nacional, as cidades das regiões sul e sudeste, que apresentam o maior desenvolvimento econômico do país, apresentam também maiores prevalências de DM e de tolerância à glicose diminuída (SARTORELLI; FRANCO, 2003). Os mesmos autores ainda comentam que no Brasil, tem-se observado um crescente número nas hospitalizações por diabetes, em

proporções superiores às hospitalizações por outras causas, o que de certa forma, traduz o aumento na sua prevalência.

Estudos realizados na região norte mostram que o DM foi responsável por 7.086 internações no ano de 2007, sendo que o estado do Pará apresentou uma parcela significativa de 48% dos internados (BRASIL, 2008).

Em relação ao estado do Amapá, de posse dos dados do Sistema de Cadastramento e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos, nos períodos de janeiro de 1999 até abril de 2008, foram diagnosticados 2.764 casos de DM, destes 947 compreendem o sexo masculino e 1817 compreendem o feminino, sendo que neste período foi o estado que teve menos internações quando comparado aos outros estados brasileiros, apresentando apenas 229 casos (BRASIL, 2001).

Segundo Smeltzer e Bare (2008), a prevalência do DM diagnosticado aumentou em todos os grupos etários, no período de 1980 a 2002. A faixa etária de 65 à 74 anos exibiu a mais elevada prevalência, seguida de pessoas com 75 anos ou mais. Os mesmos autores ainda citam que idosos acima de 65 anos correspondem a 50% das ocorrências, sendo evidenciado principalmente nos países desenvolvidos.

No Brasil, os altos índices de óbitos causados por doenças crônicas decorrem do estágio atual da transição demográfico/epidemiológica pela qual passa a população brasileira, resultando no envelhecimento populacional (MARTINS et al., 2007). Tais mudanças permitem que aspirem vida mais longa, sem preocupação com limitações, incapacidades e dependências, próprias do envelhecimento (FARDO; CREUTZBERG; SILVA, 2005).

Burisch e Bradley (1983); Ferraz (1995); Newbern e Collier (1990), relatam que, de modo geral, a doença crônica tem seu início geralmente insidioso, duração longa e indefinida, perdurando, muitas vezes, para o resto da vida, e apresenta algumas características que impõem limitações às capacidades funcionais do indivíduo.

Dentre as complicações decorrentes do mau controle metabólico do DM, destacam-se: a retinopatia, a neuropatia e a cardiopatia, as quais oneram o sistema de saúde resultando em um alto custo social (GROSS et al., 2000; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION- IDF, 1999).

Além dos custos hospitalares, devem-se levar em consideração os aspectos envolvendo custos sociais, como licenças para tratamento, aposentadorias precoces quase sempre resultantes de amputações, acidentes vasculares cerebrais, complicações tardias, cegueira, insuficiência renal, além da perda da renda do indivíduo, se ele tiver sua capacidade de trabalho comprometida por conta do DM, repercutindo negativamente nos planos pessoal e familiar e na qualidade de vida deste indivíduo (LESSA; POUSADA, 1988).

Segundo Gross et al. (2000), essa enfermidade representa um considerável encargo econômico ao indivíduo e à sociedade, especialmente quando mal controlada, sendo a maior parte dos custos diretos de seu tratamento relacionado às suas complicações, que diminuem a produtividade, a qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos.

Diante dessa realidade, faz-se necessário a busca de novas alternativas para o tratamento do DM. Atualmente, estudos sobre novas drogas hipoglicemiantes vêm sendo realizados, com enfoque especial nas plantas utilizadas da medicina popular.

2.2 As plantas medicinais e seu uso popular

Planta Medicinal pode-se considerar toda planta, que administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem ou animal, exerce algum tipo de ação farmacológica sobre este (OMS, 1998). A partir desta definição excluem-se as plantas farmacologicamente inertes, e as plantas com efeitos farmacológicos não bem demonstrados.

A história da utilização de plantas é tão antiga quanto à história da humanidade. Desde épocas imemoriais os seres humanos utilizam-se dos recursos naturais para a sua sobrevivência. Construía suas casas em harmonia com o clima da região habitada, usando folhas e troncos de árvores, as quais também lhes forneciam seu meio de transporte (CAPASSO, 2000).

Sabe-se também que, desde as mais antigas civilizações, as plantas são utilizadas como fitoterápicos, podendo-se dizer que trata-se de uma das primeiras manifestações do homem para compreender a natureza (SILVA; CARVALHO, 2004).

Desde os primórdios da evolução, o homem pré-histórico verificava através do comportamento instintivo dos animais, que certas plantas eram aptas para o consumo alimentício, mais outras não; assim como algumas plantas poderiam ser utilizadas para amenizar o sofrimento ou curar algumas doenças, e outras causavam intoxicações que poderiam ser letais (ALONSO, 1998).

Assim, através de ensaios ou ao acaso, os indivíduos foram adotando, de maneira empírica, a capacidade de descobrir e distinguir diversas plantas que possuíam efeitos medicinais, tóxicos ou aquelas que não produziam efeitos biológicos evidentes.

No entanto o que era tóxico em determinada concentração, poderia ser medicamento em diferentes concentrações ou doses. Confirmando, portanto que a descoberta das propriedades farmacológicas e a identificação da toxicidade das plantas foram processos que caminharam juntos ao longo da história (BENDAZZOLI, 2000).

É estimado pela OMS que 80% da população mundial, em especial dos países em desenvolvimento, utilizam as práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, sendo que 85% destes utilizam plantas ou preparações destas, principalmente extratos de plantas, como primeira opção (BRASIL, 2007).

A droga vegetal é um produto muito melhor tolerado pelo organismo do que as substâncias sintéticas, muito mais econômico, podendo beneficiar um número bem maior de pacientes (SILVA; CARVALHO, 2004).

Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, as plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular (MARTINS et al., 2000). Com o desenvolvimento das ciências naturais e do método científico na medicina, os medicamentos de origem vegetal tornaram-se objeto de análise científica.

Neste contexto, esforços têm sido feitos no sentido de melhorar as substâncias naturais aumentando as propriedades desejadas e minimizando seus efeitos colaterais adversos (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002).

Segundo Carlini (1995), inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para a cura ou mesmo alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade. Entretanto, muitas plantas possuem determinadas substâncias que podem, de acordo com a sua utilização, desencadear sérios danos ao organismo. Assim, se utilizada da maneira

inadequada, as preparações realizadas a partir das plantas medicinais podem prejudicar à saúde e até mesmo causar a morte do indivíduo.

2.2.1 Os efeitos tóxicos das plantas medicinais

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetais do mundo, além de inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento tradicional de plantas medicinais e tecnológicas para correlacionar o saber tradicional e científico. (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; CALIXTO, 2003b). O conhecimento tradicional, principalmente, sobre os produtos de sua biodiversidade, tem se tornado um importante instrumento no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos.

O uso popular dos preparados de plantas medicinais mostrou, ao longo dos anos, que determinadas plantas possuem substâncias potencialmente tóxicas, e devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos.

No entanto, o uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar, eticamente, os produtos naturais como eficazes e seguros. Devido a esse fato surgiram interesses comerciais e científicos que tornaram fundamentais a realização de estudos que avaliem a eficácia e segurança dessas plantas (CALIXTO *et al.*, 2005; SIMÕES, 1988).

O intenso apelo comercial advindo do forte movimento cultural dos naturalistas aqueceu, em todo mundo, o consumo de plantas medicinais, as quais são comercializadas em muitos países sem quaisquer controle ou cuidados. Assim, falsa crença na absoluta segurança de uso dos fitoterápicos tornou-se bastante disseminada. Há uma tendência em acreditar que tudo o que existe na natureza foi feito para satisfazer as necessidades humanas, não existindo riscos em seu consumo (CARVALHO; CASCON, 2003; SIMÕES, 2000, 1988).

Na terapia moderna, observa-se crescente redescoberta do valor das plantas medicinais para a cura, prevenção e tratamento de doenças. Apesar disso, o uso incorreto desses fitoterápicos pode causar danos desastrosos à saúde do indivíduo.

Os efeitos adversos dos fitoterápicos, possíveis adulterações e toxidade, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente.

Entretanto, em muitos casos, não há respeito aos limites de uso de fitoterápicos e não se fornecem informações sobre efeitos colaterais. Estudos multidisciplinares, associando fitoquímicos e farmacológicos, tornam-se cada vez mais importantes para a definição dos potenciais terapêuticos e tóxicos de extratos vegetais (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; GOMES, 2012; MACIEL; PINTO; JUNIOR, 2002).

Assim, a preocupação com a segurança do uso de plantas medicinais e suas preparações tem aumentado, visto a ampla utilização destes recursos pela população.

Deste modo, a avaliação toxicológica destes recursos terapêuticos com base em protocolos padronizados por agências regulamentadoras é de extrema importância.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, responsável pelo controle e regulamentação dos medicamentos e alimentos no Brasil, possui várias resoluções que trata especificamente de estudos toxicológicos para medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010, 2004).

Na literatura encontramos diversos estudos que comprovam a ação tóxica de plantas medicinais e fitoterápicos, relatando inclusive complicações cardíacas, hepáticas, renais, hematológicas, intestinais, teratogênicas, dentre outras (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; CLOUATRE, 2004; CORDEIRO; CHUNG; SACRAMENTO, 2005; GOMES, 2012; MENGUE et al., 2001; SOSSAI; NASONE; CANTA MALESSA, 2007; STICKEL; SEITZ, 2000; WHITTON et al., 2003; WOOLF et al., 1994; WU; GHANTOUS; BIRNKRANT, 2008; XU; LEVINE, 2008; YANG et al., 2010; YANG et al., 2001; YEONG et al., 1991).

Algumas substâncias encontradas em diversas espécies vegetais são potencialmente tóxicas. Dentre elas, podemos citar os alcaloides, sobre os quais existem estudos que comprovam sua atividade hepatotóxica e carcinogênica (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; NAVARRO MOLL, 2000; STICKEL; SEITZ, 2000; YANG et al., 2001).

Assim, muitas plantas utilizadas pela medicina popular apresenta essa substância em sua composição, dentre elas o confrei (*Symphytum officinale*), que contém alcalóides pirrolizidínicos. Muito utilizado na medicina tradicional como cicatrizante, esta espécie possui alcaloides em sua composição, sendo proibida pela ANVISA seu emprego em preparações para uso interno por ser altamente

hepatotóxico (ANVISA, 1992; RATES, 2001; RODE, 2002; STICKEL; SEITZ, 2000).

Uma outra espécie amplamente utilizada na medicina tradicional é a babosa (*Aloe vera*) que possui, inclusive comprovadamente, ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antibacteriana, anti-helmíntica, analgésica, gastroprotetora, antitumoral, cicatrizante (CARVALHO et al., 2005; CARVALHO; CASCON, 2003; LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2003; MIRANDA et al., 2000; PAIVA et al., 2003; PAIVA et al., 1998; SANTOS et al., 2008; TINCUSI et al., 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2001), dentre outras aplicações. Entretanto, estudos tem avaliado casos de indução de hepatite tóxica pela utilização dessa espécie (BOTTENBERG et al., 2007; KANAT; OZET; ATAERGIN, 2006; YANG et al., 2010).

Desta forma, devido a insuficiência de estudos que comprovem a segurança do seu uso oral, a ANVISA suspendeu a produção de alimentos e bebidas contendo *Aloe vera*, permanecendo somente registros de medicamentos fitoterápicos de uso tópico (ANVISA, 2011; CARVALHO et al., 2008;).

Uma outra substância encontrada nas plantas que causam danos aos organismo é o ácido aristolóquico, podendo causar problemas renais (LORENZI; MATOS, 2002; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Esta substância está presente em uma planta conhecida como cipó-mil-homens (*Aristolochia spp.*), muito utilizada popularmente para o tratamento de gota, artrite, reumatismo e doenças inflamatórias crônicas da pele (DEBELLE et al., 2002; LAPA et al., 2004).

Outro ponto a ser considerado é o fato de que tais produtos naturais também poderem interagir com outros medicamentos e entre si quando administrados concomitantemente (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Assim, a literatura aponta alguns estudos que demonstram o risco de interações medicamentosas relacionadas ao uso da erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*) em concomitância com outros fármacos (HENNEY, 2000; MOORE et al., 2000; DI CARLO et al., 2001).

Estudos realizados por Veiga Junior (2008) demonstraram que as plantas medicinais são utilizadas como automedicação, em associação ao medicamento sintético ou substituindo-o sem o conhecimento médico, aumentando assim o risco de interações medicamentosas.

Desta forma, os constituintes químicos das plantas medicinais de atividade tóxica ao organismo não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético. Sua preconização ou autorização oficial do seu uso medicamentoso deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias e a segurança do seu uso deve ser comprovada (SIMÕES et al., 2000).

Assim, os possíveis efeitos tóxicos das plantas medicinais e fitoterápicos devem ser avaliados, sendo de extrema importância a condução de estudos baseados nos protocolos elaborados pelas agências regulamentadoras.

Desta forma, as espécies vegetais utilizadas para recuperar e/ou manter a saúde, poderiam ser empregadas como matérias primas no desenvolvimento e produção de fitoterápicos, ou usadas na preparação de remédios de baixo teor tecnológico, com influência cultural ou não.

2.3 A fitoterapia como tratamento alternativo e complementar

Os fitoterápicos são medicamentos desenvolvidos por processos tecnologicamente adequados, utilizando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, como princípio ativo, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (ANVISA, 2010; CARVALHO, 2004). Portanto, não se considera quaisquer medicamentos como fitoterápico, nem mesmo aqueles que possuem formulações com substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, ou associações com extratos vegetais (CARVALHO, 2004).

Assim, a produção dos fitoterápicos consiste na elaboração de medicamentos preparadas através de formulações desenvolvidas a partir de partes de plantas que sofrerão processos técnicos, deixando sua composição fitoquímica íntegra, sem qualquer dano (CARVALHO, 2004; CARVALHO; CASCON, 2003).

O interesse atribuído atualmente nas terapias alternativas e produtos naturais, principalmente artigos vegetais com finalidades terapêuticas, dá-se devido a diversos fatores relacionados aos fármacos sintéticos, como por exemplo: a sua ineficiência para várias patologias, muitos efeitos colaterais, elevado custo financeiro do tratamento farmacológico, dificuldade das indústrias farmacêuticas em obter novos agentes terapêuticos, alto custo de pesquisa e

produção de novas moléculas biologicamente ativas, dentre outros motivos (CAPASSO, 2000; NIERO et al., 2003; RATES, 2001).

Além disso, algumas pessoas justificam erroneamente que as plantas medicinais e os produtos naturais delas obtidos não produzem males, o que aumenta, ainda mais, a busca por plantas que possuem atividade farmacológicas e curativas.

Mesmo com toda sofisticação e com o desenvolvimento de grandes indústrias farmacêuticas relacionadas aos fármacos sintéticos, às plantas medicinais permanecem como forma alternativa de tratamento em várias regiões do mundo. Segundo a OMS, devido a não ter como pagar tratamentos e pouco acesso à medicina moderna, cerca de 65 a 80% da população do mundo dependem essencialmente das plantas como forma primária de cuidar da saúde (CALIXTO, 2005).

Segundo Ugaz (1994), Cechinel-Filho e Yunes (1998), cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto que 50% são de origem sintética, mas relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais.

No Brasil, a utilização de fitoterápicos é bastante crescente, se levarmos em consideração o ano de 2001, no qual a venda de fitoterápicos atingiu cerca de 270 milhões de dólares, equivalente a um percentual de 5,9% da venda geral de medicamentos (CALIXTO, 2003a).

Esses produtos podem ser encontrados no mercado farmacêutico sob as mais diversificadas formas fitoterápicas, dentre elas as líquidas (extrato fluido ou líquido, tinturas, xaropes, soluções, emulsões, loções, etc.), semi-sólidas (pomada, cremes, e géis) e sólidas (cápsulas, comprimidos e drágeas), facilitando assim a sua utilização e disseminação de uso por todo o mundo (CARVALHO, 2004).

Nesse contexto, as plantas medicinais e os fitoterápicos exercem uma inestimável importância como agentes terapêuticos, possuindo um grande potencial frente a tratamentos alternativos para diversas doenças, inclusive para o DM.

2.3.1 Os fitoterápicos e o Diabetes Mellitus

A fitoterapia é um método utilizado por muitas pessoas, principalmente na região amazônica, como uma fonte de fácil aquisição e baixo custo no tratamento de várias enfermidades, dentre elas o DM.

No Brasil, existem muitas plantas com ação hipoglicemiantes oferecendo, assim, potencial para a pesquisa científica com o objetivo de validar o seu uso com eficácia e segurança.

Alguns estudos revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

Assim, a procura por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas, tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente ativas. Um exemplo é a planta *Galega officinalis*, que levou ao desenvolvimento da droga hipoglicemiante oral, Metformina (NOEL et al., 1997).

No Brasil, muitas espécies de plantas têm sido utilizadas etnofarmacologicamente para tratar os sintomas do DM, dentre elas: Abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.), Assa-peixe (*Vernonia polyanthes* e *Vernonia ferruginea* Less.), Bardana (*Actium minus* Bernh.), Cajueiro (*Anacardium occidentale*), Guandu (*Cajanus cajan* sp.), Jacareúba (*Calophyllum brasiliense*), Pata-de-vaca (*Bauhinia fortificat*), Pau-ferro (*Caesalpinia férrea*), Pau-pereira (*Aspidosperma parvifolium* A.), Quina (*Cinchona officinalis*), Tioiô (*Ocimum basilicum* L.), dentre outras (CARVALHO; DINIZ; MUKHERJEE, 2005; CARVALHO, 1998; CAVALLI et al., 2006; ELDER, 2004; ERNST, 1997; GROVER; YADAV; VATS, 2002; HANDA; CHAWLA, 1989; HOU et al., 2003; IVORRA; PAYÁ; VILLAR, 1989; JOHNS; CHAPMAN, 1995; KAR; CHAUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003, 1999; LAMBA et al., 2000; MARLES; FARNSWORTH, 1995; McCUNE; JONHNS, 2002; NEEF; DECLERCQ; LAEKEMAN, 1995; NOVAES et al., 2001; OLIVEIRA; SAITO, 1995; PEREIRA, 1997; PRESTA; PEREIRA, 1987; RAHMAN; ZAMAN, 1989; SAID et al., 2002; SAXENA; VIKRAM, 2004; SILVA et al., 2008; SILVA; PEIXOTO, 2009; SYIEM et al., 2002; VOLPATO et al., 2002).

Segundo Alarcon, Roman e Perez (1998) existem, aproximadamente, 800 espécies de plantas utilizadas no combate do diabetes, sendo que parte dessas espécies, após avaliação farmacológica, apresentou atividade hipoglicemiante.

Dentre os constituintes químicos presentes nos fitoterápicos utilizados no tratamento do DM encontram-se os triterpenóides, os alcalóides, as cumarinas e os flavonóides, os quais podem ser utilizados como modelos para a produção de novos agentes eficazes no tratamento desta síndrome (NEGRI, 2005).

As plantas com propriedades medicinais relacionadas ao DM possuem como característica principal a atividade de controle do metabolismo de carboidratos. Os mecanismos de ação são variados, pois podem atuar prevenindo e restaurando a integridade e função das células responsáveis pela liberação de insulina (células beta pancreática), estimulando a atividade de liberação de insulina, melhorando a captação e utilização da glicose, fazendo das plantas um grande potencial para o desenvolvimento para novos modelos terapêuticos (ROCHA et al., 2006).

Assim, as pessoas com DM buscam através das plantas medicinais e dos fitoterápicos tratamentos alternativos que possam minimizar as complicações ocasionadas pelo diabetes, evitar os efeitos colaterais apresentados pelos medicamentos sintéticos disponíveis atualmente e principalmente reduzir o custo do tratamento.

2.3.2 Modelos experimentais de Diabetes Mellitus

A indução experimental do DM em modelos animais permite a identificação de agentes terapêuticos e preventivos desta síndrome, além de um estudo detalhado dos eventos biológicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabético.

A literatura possui vários modelos experimentais utilizados para a indução do DM, utilizando diversos tipos de animais, entre eles: ratos, coelhos, macacos e cães. Segundo Sacks (2006), as alterações metabólicas causadas pelo DM podem ser evidenciadas, tanto em humanos quanto em animais experimentais, pela perda de peso, apesar da grande ingestão alimentar, aumento do volume urinário e de ingestão hídrica, hiperglicemia, glicosúria e elevação de uréia urinária.

O rato é o animal mais utilizado na maioria dos trabalhos experimentais relacionados à indução do diabetes experimental, tendo em vista a facilidade de sua manutenção e manipulação (alimentação, higiene, acomodação); a possibilidade de trabalhar simultaneamente com vários grupos experimentais, sem a ocupação de grandes espaços; elevada resistência a infecção; facilidade para a remoção dos diversos órgãos estudados; redução de gastos; a rapidez e segurança da indução anestésica; a possibilidade de comparação dos resultados com a literatura; e por apresentarem sinais e sintomas clínicos, parâmetros laboratoriais e histopatológicos equivalentes aos apresentados pelas pessoas com DM (LERCO et al., 2003).

O diabetes experimental pode ser induzido em animais por vários mecanismos. Os principais mecanismos de indução do diabetes experimental são: estresse, infecções, toxinas, ou manipulações incluindo a pancreatectomia, lesões do Sistema Nervoso Central-SNC, utilização de hormônios anti-insulínicos, exposição à hidrocortisona ou hormônio adenocorticotrófico, indução por vírus e o uso de agentes químicos betacitotóxicos.

Entretanto, vários desses métodos utilizados não são capazes de desenvolver a maior parte dos sinais e sintomas apresentados no DM que acometem os humanos (LERCO et al., 2003).

A maioria dos estudos realizados atualmente utilizaram os métodos químicos de supressão endócrina do pâncreas, os quais exibem todos os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico (KONRAD et al., 2001; JUNOD et al., 1969).

Segundo Lerco et al. (2003), o aloxano é o agente químico com citotoxicidade específica para as células beta mais estudado dentre a comunidade científica por apresentar características semelhantes às encontradas na síndrome diabética humana: glicosúria, polifagia, polidipsia, hiperglicemia, entre outras (CARVALHO, 2001).

O mecanismo de ação do aloxano em células beta do pâncreas tem sido investigado por muitos pesquisadores. Sabe-se que a ação citotóxica desse agente diabetogênico é mediada por espécies reativas de oxigênio (LENZEN, 2008).

Apesar de ter elevado índice de mortalidade relativa, esse método químico é de fácil execução e permitem a utilização de um grande número de

animais, destruindo a parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina. Assim, os animais desenvolvem alterações clínicas e laboratoriais bem definidas, incluindo valores glicêmicos acima de 300 mg/dL e glicose urinária maior que 500 mg/dL (LERCO et al., 2003).

O aloxano (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) foi descrito inicialmente por Brugnatelli em 1818. Wöhler and Liebig foram os pesquisadores que utilizaram pela primeira vez o termo “aloxano” e descreveram sua síntese por oxidação do ácido úrico (SZKUDELSKI, 2001).

A atividade diabetogênica do aloxano, por sua vez, foi notada depois de muito tempo por Dunn et al. (1943), quando estudava os efeitos do ácido úrico e seus derivados na produção da lesão renal em coelhos, o qual observou em seu estudo que a droga havia produzido uma lesão nas Ilhotas de Langerhans, levando seus animais a óbito por hiperglicemia.

O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais comumente utilizados, por possuir uma citotoxicidade específica para as células beta do pâncreas, a qual causa insuficiência insulínica primária, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subsequentes (LERCO et al., 2003).

O mecanismo de ação do aloxano no organismo tem sido estudado por muitos anos, utilizando-se predominantemente ensaios *in vitro*, com a utilização de ilhotas de Langerhans isoladas ou pâncreas perfundido.

Assim, alguns estudos relatam que o mecanismo da ação citotóxica do aloxano ocorre através da produção de espécies reativas de oxigênio, produzidas a partir de agentes redutores como a glutatona e a cisteína, aumentando assim a concentração de cálcio citosólico (ELSNER et al., 2002; SZKUDELSKI, 2001).

Assim, esta droga é capaz de destruir especificamente as células beta das Ilhotas de Langerhans, quando administrado em doses adequadas, induzindo sintomas equivalentes ao DM tipo 1, a qual se desenvolve quando mais de 90% das células beta são destruídas (ZANOELLO et al., 2002).

Segundo Zanoello et al. (2002), a citotoxicidade seletiva do aloxano é condicionada pela grande capacidade da célula beta em acumular a droga, aliada ao fato de esta célula demonstrar maior sensibilidade aos radicais peróxidos quando comparada a outros tecidos.

Segundo Lukens (1948), Katsumata et al. (1992) e Szkudelski (1998), o jejum tem um papel importante na resposta de animais à injeção de aloxano. Os autores relatam que, em alguns estudos, 95% de ratos quando tratados com aloxano administrado com o animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos, enquanto que, sem o jejum, a administração de uma dose similar de aloxano, diminui essa resposta para 25%.

Em diversos modelos experimentais utilizando o aloxano, a droga é administrada por via endovenosa, pois estudos sugerem que outra via de administração pode diminuir sua resposta hiperglicêmica, devendo ser injetada rapidamente, pois doses efetivas de aloxano não produzem diabetes se as mesmas forem injetadas muito lentamente (LERCO et al., 2003; SOARES; COSTA; CECIM, 2000).

Após a administração do aloxano, o pâncreas lança uma demanda exorbitante de insulina na circulação sanguínea, devido à destruição das células beta. Assim, o fornecimento de uma solução de glicose 10% como única fonte hídrica durante as primeiras 24 horas após a indução do diabetes é fundamental para evitar uma hipoglicemia fatal, reduzindo assim o número de mortes dos animais (MAZZANTI et al., 2003).

2.4 A espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess

A espécie *Calophyllum brasiliense* Cambess, pertencente à família Clusiaceae, sendo conhecida no Brasil por diversos nomes populares, dentre eles: jacareúba, cedro-do-pântano, guanandi, guanandi-cedro, guanandi-carvalho, guanandi-landium, guanandi-piolho, guanandi-rosa, landi, landim, landium, olandi, olandim, entre outros (PEREIRA; GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1966).

Esta espécie possui distribuição geográfica bastante ampla, ocorrendo desde o México até a América do Sul tropical. No Brasil pode ser encontrada na Amazônia, no Cerrado e na Mata Atlântica, desde o Estado do Amazonas até Santa Catarina, sempre condicionada à condição de umidade do solo, sendo uma espécie nativa do território nacional (OLIVEIRA, 1994; REITZ; KLEIN; REIS, 1978; SILVA et al., 2001).

Na Amazônia, é frequente nas várzeas e igapós. Nos cerrados, habita as matas de galeria. Cresce bem em solos aluviais, argilosos, sílico-argilosos ou

arenosos, e apresenta excelente adaptação tanto a ambientes encharcados quanto a locais secos. Estas características fazem com que a espécie seja muito frequente em vários ambientes ribeirinhos do sudeste do Brasil e também em outros tipos de ambientes neotropicais onde o solo é permanentemente ou periodicamente inundado (LIMA et al., 1994; SCARANO et al., 1997).

É uma árvore de grande porte, que pode atingir altura entre 15 e 50 m e diâmetro à altura do peito entre 30 e 180 cm. O fuste é ereto e cilíndrico e a copa é piramidal a ovóide (LIMA et al., 1994).

A casca do caule possui coloração parda de aproximadamente 2 cm de espessura, é fissurada fusiforme, dura, aromática, amargosa e ácida. As folhas são decussadas, pecioladas, coriáceas, simples, inteiras, elípticas, oblongas ou oblongas-lanceoladas, brilhantes em ambas as faces, sem cera, coriáceas, glabras ou esparsamente pubérulas com pêlos claros, medindo de 10 a 13 cm de comprimento por 5 ou 6 cm de largura; a base é emarginada ou cuneada; o ápice é agudo, obtuso ou arredondado (SILVA, 2005).

Suas nervuras laterais são numerosas, paralelas, peninervada, muito próximas entre si e proeminentes em ambas as faces, possuindo formato elíptico em forma de lança (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998; SILVA, 2005).

É uma espécie andromonóica, com inflorescências racemosas ou compostas de ramos curtos, com 2-10 flores axilares ou terminais; os pedicelos medem entre 2 e 5 mm; as flores possuem em média 2 pétalas reflexas de coloração creme-amarelada, com estames numerosos nas flores masculinas e poucos nas hermafroditas; as anteras são oblongas; o ovário súpero unilocular é ovóide nas flores hermafroditas; o estilete é curto; o estigma é obtuso (CORRÊA, 1984; LORENZI, 1998; SILVA, 2005).

Os frutos são do tipo globosos, ovóides ou elipsóides, classificados por muitos como uma drupa oleaginosa e por outros como um bacáceo, com aproximadamente 2,5 cm de diâmetro; o epicarpo coriáceo apresenta coloração verde, verde-clara a verde-amarelada; o mesocarpo carnoso de coloração amarelada possui abundante látex da mesma coloração; o endocarpo é delgado; cada fruto contém geralmente 1 semente (SILVA, 2005).

A semente é globosa, ovóide ou esférica, medindo cerca de 1,0 a 2,5 cm de comprimento e 1,4 a 2,2 cm de diâmetro; a superfície é castanho-clara, fosca, densa, dura, glabra e rugosa, por causa de saliências resinosas; os cotilédones

são carnosos. A plântula apresenta caulículo glabro, rugoso e coloração verde-escura; as folhas são decussadas, curto pecioladas, simples, agudo-lanceoladas e glabras (SILVA, 2005).

Com tronco forte e durável, sua madeira apresenta múltiplos usos, desde a construção civil e fluvial até a marcenaria, compensados, papel e barris para vinho. Sua madeira é altamente resistente a fungos e a cupins, característica essa atribuída aos metabólitos secundários presentes na árvore. Sua casca produz uma resina amarelada, chamada de “bálsamo de landim”, cujo emprego medicinal necessita de estudos (METCALFE; CHALK, 1950; SILVA, 2005).

Por produzir um óleo essencial, o qual é extraído da árvore, essa planta é muito utilizada como aromatizante. O óleo contido nas sementes também pode ser utilizado como combustível de lamparinas (METCALFE; CHALK, 1950; SILVA, 2005).

A árvore vem sendo usada na recomposição de matas ciliares e o seu emprego no paisagismo e arborização urbana precisa ser avaliado, devido à possibilidade de irritação cutânea em pessoas provocada pela resina (SILVA, 2005).

Na medicina popular é muito utilizada para diversas doenças como bronquite, distúrbios hepáticos e gástricos, dor, inflamação, diabetes, hipertensão, diarreia, reumatismo, hemorróidas, varicose, herpes (SILVA et al., 2001).

2.4.1 Aspectos químicos

As plantas do gênero *Calophyllum* possuem uma rica fonte de substâncias bioativas, caracterizando-se principalmente pela presença de cumarinas, xantonas, esteróides, taninos, triterpenos e biflavanóides, chalconas, benzofuranos, flavonas e flavonóides, e a ausência de alcalóides, quinonas, saponinas (BUFFON, 2005; SARTORI et al., 1999).

Dentre os compostos químicos isolados da espécie *Calophyllum brasiliense*, destacam-se as xantonas brasixantona A, guanandina, jacareubina e 6-desoxijacareubina, e as cumarinas denominadas de calanolídeos A, B e C, soulatrolídeo e mammea A/BA (MUNDO, 2007; PEREIRA; GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1966; SARTORI et al., 1999; SILVA et al., 2001).

Pereira (1997) isolou a friedelina, guanandina, isoguanandina, β -sitosterol, jacareubina, 6-desidroxijacareubina, 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona, 1,7-dihidroxi-3-metoxixantona, gentisina e 4-hidroxixantona do extrato benzênico do lenho da *Calophyllum brasiliense*.

Lima et al. (1994) isolaram os ácidos brasiliênsico, isobrasiliênsico e inofilóidico da resina da casca, 6-dehidroxijacareubina, da guanandina [1,5-dihidroxi-6-(3',3'-dimetilalil) xantona], isoguanandina [4,8-dihidroxi-1-(3'3'-dimetilalil) xantona] e dehidroxicloguanandina, isoladas do extrato hexânico do lenho. No óleo das sementes, foram encontrados seis ácidos carboxílicos homólogos, sendo os três ácidos da série trans obtidos em maior quantidade os ácidos isoapetálico, bancóico.

Conforme Caneppele (1998) e Buffon (2005) da resina da casca foram isolados os ácidos brasiliênsico e isobrasiliênsico e da fração diclorometânica (DCM2) do extrato hexânico da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* isolaram as três cromanonas: ácido inofilóidico, ácido brasiliênsico e ácido isobrasiliênsico.

2.4.2 Aspectos farmacológicos

Na área da farmacologia, os estudos sobre a *Calophyllum brasiliense* são muito poucos. Entretanto, alguns pesquisadores já verificaram que o extrato desta planta possui atividade anti-HIV, onde atua inibindo a transcriptase reversa (HUERTA-REYES et al., 2004). Os calanolídeos A e B impedem a replicação do HIV-1 *in vitro*, provavelmente por inibição da atividade enzimática da DNA-polimerase dependente de DNA e da DNA-polimerase dependente de RNA presentes no vírus (KUSTER; ROCHA, 2000).

Alguns constituintes identificados das folhas de *Calophyllum brasiliense* possuem atividade contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (ABE et al., 2004). Alguns ácidos cromanônicos isolados de casca e do caule possuem atividade contra *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis* (COTTIGLIA et al., 2004).

De acordo com estudos realizados por Pretto (2005), os extratos brutos de raízes e flores de *Calophyllum brasiliense* apresentaram atividades significantes, moderadamente ativas, contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. O mesmo estudo demonstrou que o extrato das folhas e das flores desta espécie

apresentaram atividades antimicrobianas contra microorganismos Gram-positivos como: *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae* e *Bacillus cereus*; não apresentando, porém, atividade satisfatória perante os microorganismos Gram-Negativos como *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*.

O extrato metanólico da entrecasca de *Calophyllum brasiliense* atenuou lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Os extratos hexânico e diclorometânico da entrecasca também foram ativos contra estes modelos de úlcera, tendo maior atividade o extrato hexânico. O subsequente fracionamento do extrato hexânico revelou a atividade máxima antiúlcera da fração DCM2 (SARTORI et al., 1999).

A fração DCM2 do extrato hexânico de *Calophyllum brasiliense* possuem efeito gastroprotetor em razão da ação antissecretora, antiúlcera e citoprotetora (SARTORI et al., 1999). Estudos comprovaram que este mesmo preparado não apresenta alterações significativas no trânsito gastrointestinal em camundongos e não produz efeito tóxico aparente em ratos, sem apresentação de alterações significativas no ganho de peso, consumo de água e ração (SARTORI et al., 1999).

Algumas cumarinas isoladas de *Calophyllum brasiliense* são consideradas potentes inibidores *in vitro* de sulfotransferases, enzimas envolvidas no metabolismo de compostos endógenos principalmente esteróides (MESÍA-VELA et al., 2001). As brasixantonas, identificadas do extrato de caule, possuem significativa atividade antineoplásica (ITO et al., 2003).

Nas espécies estudadas do gênero, as xantonas mostram-se mais frequentes e diversificadas, na qual se destaca as atividades antiinflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antitumorais, citotóxicas e inibitória de algumas enzimas como a monoamino oxidase e peroxidase lipídica (PEREIRA; GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1966; SARTORI et al., 1999; SILVA et al., 2001).

Algumas xantonas como 6-desoxijacareubina, jacareubina, 1-hidroxi-3,5,6-tri-O-acetil-2-(3,3-dimetilalil)-xantona e algumas cumarinas como mammea A/BA e mammea C/AO isoladas de *Calophyllum brasiliense*, apresentaram uma ação inibitória sobre a liberação de ácidos estomacais (REYES-CHILPA et al., 2006).

Estudos relataram ainda a presença de taninos, saponinas, triterpenos, xantonas, auronas e chalconas no extrato metanólico da entrecasca do caule da espécie coletada em Mato Grosso. Este extrato apresentou atividade antiúlcera em modelos de úlcera gástrica por etanol e por ligação pilórica, analgesia periférica, baixa toxicidade oral e ausência de atividade sobre o trânsito intestinal em animais de laboratório (LIMA et al., 1994).

Além destes, esta espécie possui ainda compostos que atuam inibindo a H^+, K^+ -ATPase gástrica, atividade antitumoral, atividade anti-leishmania, inibição da enzima conversora de angiotensina (CARVALHO, 1994).

Diversos estudos demonstram que a *Calophyllum brasiliense* também tem sido utilizada popularmente para auxiliar no controle do DM, havendo uma diminuição na glicemia das pessoas que a utilizam (LINO et al., 2004; LORENZI; MATOS, 2002; VAN DEN BERG, 1993).

Esse efeito pode ser, pelo menos parcialmente, atribuído aos terpenóides e cumarinas presentes nesta planta. O efeito dos terpenóides parece envolver a estimulação das células β -pancreáticas com a subsequente secreção da insulina e o mecanismo de ação hipoglicemiante das cumarinas provavelmente envolve hepatotoxicidade (OJEWOLE, 2002).

Em relação à toxicidade da espécie, Pretto (2005) realizou ensaios com compostos de *Calophyllum brasiliense* utilizando *Artemia salina*, demonstrando que os compostos não possuem ação citotóxica sobre as células. Entretanto, pelo fato dos compostos possuírem, possivelmente, ação hipoglicemiante; se administrado de maneira incorreta, podem causar efeitos graves de hipoglicemia como perda da consciência, convulsão e coma hipoglicêmico.

Quando se torna severa (glicemia abaixo de 30 mg/dL) e não é corrigida, a hipoglicemia pode levar à lesão cerebral permanente e, ocasionalmente, à morte (ADA, 1998).

Algumas plantas associadas ao tratamento do DM são consideradas tóxicas devido ao fato de induzir a hepatotoxicidade e/ou bloqueio beta adrenérgico, levando a hipoglicemia (NEGRI, 2005).

Assim, pode-se observar que a espécie é utilizada frequentemente pela população para cuidados terapêuticos complementares, para os mais diversos tipos de enfermidades, possuindo inclusive muitas dessas atividades comprovadas cientificamente.

Entretanto, durante a revisão de literatura deste estudo, não se obtiveram resultados que comprovassem cientificamente a atividade hipoglicemiante da espécie.

3 METODOLOGIA

3.1 Caracterização do estudo

O presente estudo foi do tipo experimental controlado, no qual foi utilizado o método quantitativo, do tipo ensaio pré-clínico e randomizado.

Pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde não oferecer um modelo para a construção e formatação da dissertação, este trabalho foi formatado de acordo com as normas vigentes da Associação Brasileira de Normas e Técnicas-ABNT (2003, 2001a, 2001b, 2000, 1989a, 1989b, 1989c).

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, situado no prédio das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, localizada na Rodovia Juscelino Kubitscheck, Km-02, s/n, bairro do Zerão, município de Macapá, estado do Amapá, Brasil.

Por se tratar de um estudo que envolve a utilização de animais, este foi realizado de acordo com as recomendações dispostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais, pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA, e com as resoluções do Conselho Federal de Medicina Veterinária e demais leis vigentes que estabelecem normas práticas didático-científica de conduta de pesquisa experimental em animais (BRASIL, 2008, 2009; CFMV, 2002, 2008; COBEA, 1991; NEVES et al., 2013; ONU, 1978; ZIMMERMANN, 1983).

Devido ao fato de não haver comitê de ética em experimentação animal nesta instituição, este estudo foi encaminhado à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) para a avaliação e emissão do parecer consubstanciado, sendo aprovado sob o protocolo nº 002A/2012 de 06 de agosto de 2012.

3.2 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi obtido no Município de Ferreira Gomes (em área de ocorrência nativa), Estado do Amapá, Brasil. O material coletado foi identificado no Herbário do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, sendo armazenado com o número de série 0598AP.

Para obtenção do EBHECb utilizou-se a entrecasca da *Calophyllum brasiliense* Cambess., a qual foi lavada com água, retirando-se o excesso de impurezas, e seca a sombra em temperatura ambiente. Após esse processo, o material foi moído em moinho de facas elétrico, armazenado em embalagens adequadas e acondicionadas em temperatura média de $2 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sendo utilizado nas técnicas subsequentes.

De posse do material moído procedeu-se a obtenção do extrato fluído, armazenando-se 2 kg da entrecasca da espécie botânica na cesta de coleta do percolador de aço inoxidável (LM20, Lemaq Ltda, São Paulo, Brazil), umedecendo-o por completo com 10 litros de álcool etílico a 70%, permanecendo em maceração por durante 7 dias com temperatura constante de 45°C .

Após esse período a solução extrativa foi retirada e filtrada com papel de filtro, obtendo-se o extrato de coloração marrom escuro, o qual foi devidamente armazenado em frasco de vidro âmbar, a temperatura ambiente, longe do calor e da luz solar direta.

Após a obtenção do extrato da *Calophyllum brasiliense*, procedeu-se a evaporação do etanol através do evaporador rotativo (Q.218.2, Quimis Ltda, São Paulo, Brasil) em temperatura de 60°C , com velocidade de rotação constante, acoplado a bomba de vácuo, até a evaporação completa do solvente. O extrato aquoso obtido no processo anterior foi submetido a liofilização, obtendo-se o EBHECb.

Assim, para o cálculo do rendimento total do extrato, utilizando-se 500 mL do extrato, o qual foi rotaevaporado e liofilizado, obtendo-se o rendimento total do extrato de 1,276%, através da fórmula: **$\text{Re} = (\text{Peb} / \text{Pet}) \times 100$** .

Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); Peb=peso do extrato bruto (g); Pet=Peso da entrecasca triturada (g) utilizada para a obtenção do extrato.

O EBHECb foi diluído em água destilada para a preparação de soluções de acordo com a dose a ser administrada.

3.3 Descrição dos animais

Neste estudo foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*, linhagem *Wistar*), pesando em torno de 250 ± 50 g, e camundongos machos (*Mus musculus*, variedade *albinus*, linhagem *Swiss*), pesando em torno

de 25 ± 5 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade de Campinas – UNICAMP. Durante as atividades os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais de aço inox, devidamente identificadas medindo 60x50x22 cm, mantidos em ambiente climatizado, com temperatura a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$, fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, sendo alimentados com ração balanceada padrão para roedores (NUVILAB-NUVITAL Nutrientes Prod. Vet. Ltda – Curitiba PR) e água “*ad libitum*”.

No final de cada etapa deste estudo, os animais foram submetidos a inalação de gás carbônico em câmara própria.

3.4 Avaliação da toxicidade

3.4.1 Determinação da dose letal média e teste toxicológico agudo

Para a determinação da dose letal média (DL_{50}) e avaliação do teste toxicológico agudo seguiu-se os protocolos adotados pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 2002, 2001a, 2001b, 1987) com algumas adaptações. Desta forma, foram utilizados quatro grupos de camundongos ($n=10$), os quais receberam doses únicas de diferentes concentrações do EBHECb administrados por via oral. Assim, nos diferentes grupos, foram administradas as doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg do EBHECb (v.o.), sendo que o grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal, v.o.).

Os animais foram privados da alimentação por um período de 14h antes do tratamento. Após a administração, os animais foram observados em busca de sinais tóxicos gerais e de mortalidade (ALMEIDA et al., 1999; MARIZ, 2007), afim de identificar supostas alterações no SNC e Sistema Nervoso Autônomo-SNA (APÊNDICE I).

A observação desses sinais ocorreu aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após administração da dose única no primeiro dia e nos 14 dias seguintes (BRITO, 1994). Os animais eram observados e pesados apenas uma vez por dia, diariamente, sempre no mesmo horário, sendo determinada a evolução ponderal dos animais (g). Ao final das atividades experimentais, verificou-se a variação da massa corporal, através da fórmula: **Variação de Peso (Δ) = Peso Final – Peso Inicial** (BRASIL, 1996; ZAUPA et al., 2002).

O número de animais mortos foram expressos em percentagem e a DL₅₀ estabelecida graficamente empregando-se a percentagem de morte versus o log das doses (BRITO, 1994).

3.4.2 Avaliação da toxicidade sub-aguda

Para avaliação da toxicidade sub-aguda, os animais (ratos) foram divididos em quatro grupos (n=5) de acordo com o sexo, sendo dois grupos controles tratados diariamente com água destilada (0,5 mL/animal, v.o.) e dois grupos tratados com 500 mg/kg de EBHECb (v.o.).

Assim, por um período de trinta dias, foi avaliada a massa corporal diária (g), consumo diário de ração (g) e consumo diário de água (mL), sendo registrado em protocolo experimental (APÊNDICE II). Ao final das atividades, após o sacrifício dos animais, procedeu-se a análise macroscópica dos órgãos, o peso absoluto (g) e o peso relativo através do índice (%) das vísceras (baço, coração, fígado, pulmões, rins).

Para calcular o índice de cada órgão, utilizou-se uma equação (BRASIL, 1996; MARIZ, 2007; MELO-DINIZ, 2000; VIJAYALAKSHMI; MUTHULAKSHMI; SACHDANANDAM, 2000; ZAUPA et al., 2002), relacionando a média do peso absoluto de cada órgão com a média do peso corporal do respectivo grupo de animais, através da equação: **Índice do órgão = (peso do órgão / peso corporal) x 100.**

Além disso, foram realizados exames laboratoriais como hemograma completo (hemácias totais-RBC, hemoglobinas totais-HGB, hematócrito-HCT, volume corpuscular médio-MCV, hemoglobina corpuscular média-MCH, concentração de hemoglobina corpuscular média-MCHC, largura da distribuição de células vermelhas-RDW, contagem de plaquetas-PLT, volume principal de plaquetas-MPV, largura da distribuição de plaquetas-PDW, leucócitos totais-WBC, linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos) e análise bioquímica sanguínea (albumina, ácido úrico, bilirrubina total, bilirrubina direta, colesterol total, creatinina, fosfatase alcalina, gama-glutamyltranspeptidase-Gama GT, glicose, proteínas totais, aspartato aminotransferases-AST, alanina aminotransferases-ALT, triglicérides e uréia) para identificação de toxicidade sistêmica dos animais.

3.5 Avaliação da atividade hipoglicemiante

A indução do diabetes experimental foi realizada de acordo com o protocolo usado pela Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual de São Paulo (LERCO et al., 2003), sendo realizada algumas adaptações.

Os animais (ratos) foram submetidos a um período de adaptação de sete dias. Antes da indução do diabetes experimental, foi realizado um jejum de 24 horas, sendo mantida hidratação com água *ad libitum*.

O diabetes experimental foi induzido pela administração endovenosa de aloxano (Alloxan monohydrate, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA, lote 083K2511). Para a realização desse procedimento os animais foram anestesiados com Tiopental Sódico (45 mg/kg), procedendo-se assim a inoculação da droga, utilizando-se agulhas de calibre 13 x 4,5mm. A droga foi diluída em Cloreto de Sódio a 0,9%, e administradas por infusão rápida, em dose única de 42 mg/kg através da veia femoral.

Decorridos trinta minutos do tratamento, os animais foram alimentados normalmente, recebendo uma solução de glicose a 10% como única fonte hídrica, por um período de 24 horas.

No sétimo dia após a indução do diabetes, foi determinada a glicemia de jejum e a glicosúria de todos os animais, sendo considerados diabéticos apenas os animais que apresentarem a glicemia de jejum superior a 300 mg/dL com glicosúria positiva igual ou superior a 300 mg/dL. Assim, os animais foram distribuídos aleatoriamente para compor os diferentes grupos experimentais.

Para avaliação da atividade hipoglicemiante, os animais foram distribuídos em quatro grupos (n=5/grupo), de acordo com o tipo de droga administrada diariamente, sendo eles: um grupo de animais com diabetes induzida por aloxano, tratados com água destilada (0,5 mL/animal); um grupo de animais com diabetes induzida por aloxano, tratados com EBHECb (500 mg/kg – v.o.); um grupo de animais com diabetes induzida por aloxano, tratados com 4UI de insulina Biohulim NPH (BIOBRÁS) por via subcutânea, sendo administrado 2UI pela manhã (8:00 horas) e 2UI à tarde (18:00 horas); e um grupo de animais normoglicêmicos, tratados com água destilada (0,5 mL/animal).

Os animais foram tratados uma vez ao dia, com exceção do grupo tratado com insulina que foram realizadas duas administrações por dia, por um período de trinta dias após a confirmação da indução do diabetes experimental.

3.5.1 Avaliação clínica e laboratorial

Os dados clínicos dos animais foram avaliados através da massa corporal, ingestão hídrica, consumo de ração, volume urinário (APÊNDICE III), sendo observado alguns aspectos comportamentais que poderiam ser apresentados pelos animais durante a manipulação como irritabilidade, dor, turgor da pele, dentre outros possíveis sinais de toxicidade.

Para a avaliação do peso utilizou-se uma balança analítica, sendo calculado o desenvolvimento ponderal dos animais através da diferença entre os pesos corpóreos observados nos dias de tratamento. O consumo diário de ração e água foi mensurado diariamente através de balança analítica e proveta graduada, respectivamente.

Para determinação do volume urinário, a urina de 24 horas foi coletada em frascos de vidro e o seu volume foi mensurado em proveta graduada.

Estes parâmetros foram analisados no sétimo dia após a indução do diabetes experimental, para confirmação do mesmo, sendo avaliados diariamente em horário pré-estabelecido por um período de trinta dias (LERCO et al., 2003).

Os parâmetros laboratoriais, referentes às dosagens de glicemia e glicosúria, foram avaliados em intervalos de cinco dias, até o final do tratamento.

A coleta do sangue para análise da glicemia foi realizada por rompimento do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro (SILVA et al., 2005b; WAYNFORTH, 1980).

Após coletadas, as amostras biológicas (sangue e urina) foram armazenadas em tubos de ensaios estéreis sem substância anticoagulante, centrifugadas e analisadas em espectrofotômetro (UV-VIS mini 1240, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) para quantificação da glicemia e glicosúria dos animais por meio de reagente fotolorimétrico específico para glicose (GLUCOX 500, lote nº 10231810011, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda., Goiânia, Goiás, Brasil).

3.6 Análise estatística

A seleção da amostra, no início de cada experimento, obedeceu ao método de amostragem probabilística do tipo amostras aleatórias simples, o qual foi utilizado para assegurar que cada um deles tivesse uma probabilidade igual de serem colocado em cada um dos grupos do estudo (JEKEL, ELMORE, KATZ, 1999).

Na atividade de toxicidade utilizou-se o Teste t de Student pareado de duas amostras, onde compararam-se os grupos de machos e fêmeas tratados com seus respectivos controles (BERQUÓ et al., 1981).

Para a atividade hipoglicemiante utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguido do teste Teste de Tukey para comparações múltiplas, comparando-se o grupo de animais diabéticos não tratados (controle) com os demais grupos experimentais (BERQUÓ et al., 1981).

Assim, foi previamente fixado o nível de significância $\alpha = 0.05$ para rejeição da hipótese nula. Os testes de hipótese foram realizados sob o suporte computacional dos softwares GraphPad InStat® versão 3.0 e GraphPad Prism® versão 5.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média, por meio de figuras e tabelas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de doenças geralmente é acompanhado pela crença de que elas apresentam baixa toxicidade devido a sua origem natural.

As plantas medicinais, assim como os medicamentos convencionais, possuem em sua composição substâncias químicas responsáveis pelos efeitos biológicos, de acordo com a sua indicação.

Além de sua composição química, a toxicidade de uma planta pode estar relacionada a influências biogeográficas, à parte da planta utilizada para o preparo dos extratos, o solvente utilizado, entre outros, bem como a variedade da planta (BEUTLER et al., 2008).

Assim, se utilizadas de maneira inadequada, fatores como o modo de preparo e dose administrada, podem provocar efeitos adversos ou colaterais, interações medicamentosas e intoxicações medicamentosas relacionadas a utilização daquela substância (SEEF, 2007; SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS-SINITOX, 2011).

Esses efeitos, conhecidos como efeitos tóxicos, podem ser esperados ou não de acordo com o grau de conhecimento científico sobre determinada espécie, podendo levar a sérios danos à saúde e até mesmo causar a morte do indivíduo.

Os principais objetivos da avaliação da segurança nos ensaios pré-clínicos incluem a caracterização dos efeitos tóxicos considerando o órgão alvo, dose dependência, tempo de exposição, reversibilidade dos efeitos e tempo em que os sinais de toxicidade aparecem e desaparecem (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA, 2010).

A toxicidade aguda está relacionada a exposição a uma substância química por menos de 24 horas, mesmo sendo realizada apenas uma administração (KLAASSEN; WATKINS, 2012). Segundo Valadares (2006) os testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar e rotular apropriadamente as substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade.

Assim sendo, os testes de toxicidade aguda realizados neste estudo em camundongos de ambos os sexos, não produziram mortalidade em 14 dias de observação após o tratamento dos animais.

Desta forma, não houve como determinar a DL_{50} , pois a mesma está situada em doses superiores a 2000 mg/kg, quando administrado o EBHECb por via oral em dose única em camundongos, sendo então considerado seguro (OECD, 2002, 2001a, 2001b, 1987).

Nenhuma alteração comportamental diferenciada foi observada nos animais tratados com EBHECb quando comparados ao grupo controle. Em relação a evolução corporal, observou-se uma equivalência entre os grupos nos dois tratamentos, não apresentando resultados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da administração do EBHACb por via oral sobre o desenvolvimento ponderal (g) de camundongos machos e fêmeas tratados no período de 14 dias.

	GRUPO	N	PESO INICIAL	PESO FINAL	Δ
MACHOS	500 mg/kg	10	50.6 $\pm$ 1.35	52.0 $\pm$ 1.17	1.4
	1000 mg/kg	10	52.7 $\pm$ 1.27	54.7 $\pm$ 0.89	2.0
	2000 mg/kg	10	48.9 $\pm$ 0.96	50.6 $\pm$ 1.31	1.7
	Controle (AD)	10	58.8 $\pm$ 1.06	61.8 $\pm$ 1.25	3.0
FÊMEAS	500 mg/kg	10	50.4 $\pm$ 0.71	51.7 $\pm$ 1.60	1.3
	1000 mg/kg	10	49.0 $\pm$ 0.43	50.3 $\pm$ 1.37	1.3
	2000 mg/kg	10	49.8 $\pm$ 1.13	50.5 $\pm$ 0.68	0.7
	Controle (AD)	10	44.8 $\pm$ 0.86	45.0 $\pm$ 0.72	0.2

Dose única de água destilada (0,5 mL/ animal) e EBHACb (500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg). Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=10/grupo). Não houve resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

Segundo Vital et al. (2009), estes fatos indicam a ausência de 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 SNA (ALMEIDA, 2006).

Em estudos realizados por Zaupe et al. (2002), no teste agudo feito com o produto Propovit Plus® em roedores também não foi possível obter a DL_{50} , mesmo utilizando as doses máximas sugeridas pela literatura, não apresentando diferença estatística no desenvolvimento ponderal, tanto dos machos quanto das fêmeas.

Em relação a atividade toxicológica sub-aguda, como afirma Klaassen e Watkins (2012), está relacionada a exposição repetida de um organismo a uma determinada substância química por um período de um mês ou menos, o que pode levar a toxicidade sistêmica do organismo, dependendo do seu grau de exposição.

A toxicidade sistêmica pode ser identificada através da diminuição do peso corporal dos animais e por alterações no consumo de água e ração (CUNHA et al., 2009), além de sinais comportamentais como prostração, apatia e a presença de pelos eriçados. Segundo Valadares (2006), esses fatores são importantes por fornecerem informações precisas sobre o estado geral da saúde dos animais.

Segundo Lapa et al. (2004), a toxicidade sistêmica também pode ser diagnosticada através de alterações relacionadas a massa relativa dos órgãos, sendo importante para a avaliação da toxicidade de uma determinada substância nociva ao organismo.

A administração oral do EBHACb causou aumento do desenvolvimento ponderal (Figura 1) e do consumo de água e ração (Figuras 2 e 3) sendo que essas alterações não possuem significado toxicológico. Assim, não foram observadas alterações comportamentais indicativas de toxicidade e nenhuma morte foi registrada.

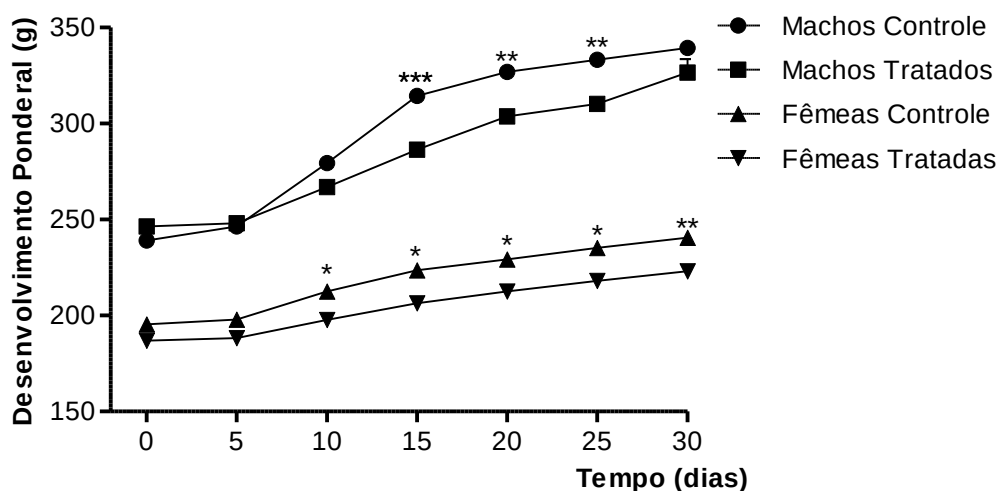


Figura 1. Efeito do tratamento diário por via oral com EBHACb (500 mg/kg) sobre o desenvolvimento ponderal (g) de ratos machos e fêmeas no período de 30 dias. O grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=5/grupo), sendo que *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 representam resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

A alteração do peso corporal é um parâmetro utilizado nos ensaios toxicológicos como um indicador dos efeitos adversos de drogas e substâncias químicas (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002), sendo importante que os animais sobreviventes não percam mais do que 10% do seu peso corporal inicial (KLAASSEN; WATKINS, 2012).

Já a análise da ingestão de alimentos e água em uma experimentação animal é importante para investigar a segurança das substâncias estudadas com intuito terapêutico (OLIVEIRA et al., 2013).

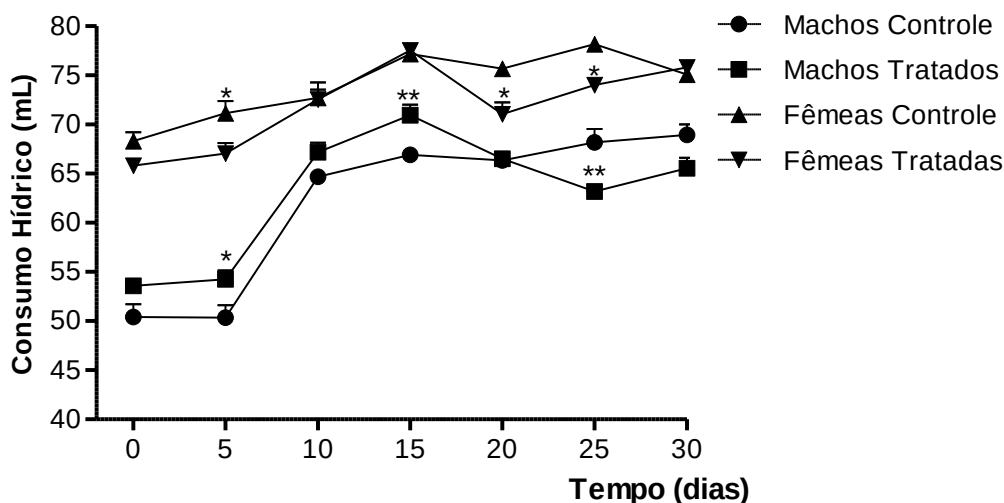


Figura 2. Efeito do tratamento diário por via oral com EBHACb (500 mg/kg) sobre o consumo hídrico (mL) de ratos machos e fêmeas no período de 30 dias. O grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=5/grupo), sendo que * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representam resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

Alguns hormônios, como os peptídicos, exercem influência direta no controle da ingestão de água, no consumo de alimento e no balanço energético (WREN et al., 2001). Um estudo realizado por Mietlick et al. (2011) revelou que o hormônio grelina, com sítios de ação em áreas hipotalâmicas, atenuou o consumo de água nos machos tratados com solução salina hipertônica.

Por outro lado, a administração oral do antagonista deste hormônio na dieta de camundongos obesos promoveu à redução no consumo de ração e no desenvolvimento ponderal, confirmando o envolvimento desse peptídeo no processo de alimentação e ingestão de água (ESLER et al., 2007).

Os consumos de água, ração e a produção de excreta variaram entre os grupos ao longo do experimento, mas isso não refletiu na saúde e no estado geral dos animais, onde os animais se apresentaram sempre ativos e responsivos aos estímulos.

A determinação do consumo de ração e água é muito importante nos estudos de segurança de produtos com finalidade terapêutica, uma vez que a ingestão adequada de água e ração são essenciais para a manutenção fisiológica do animal e para se obter resposta adequada ao produto testado; e não uma “falsa” resposta, devido às condições nutricionais inadequadas (STEVENS; MYLECRAINE, 1994; IVERSEN; NICOLAYSEN, 2003).

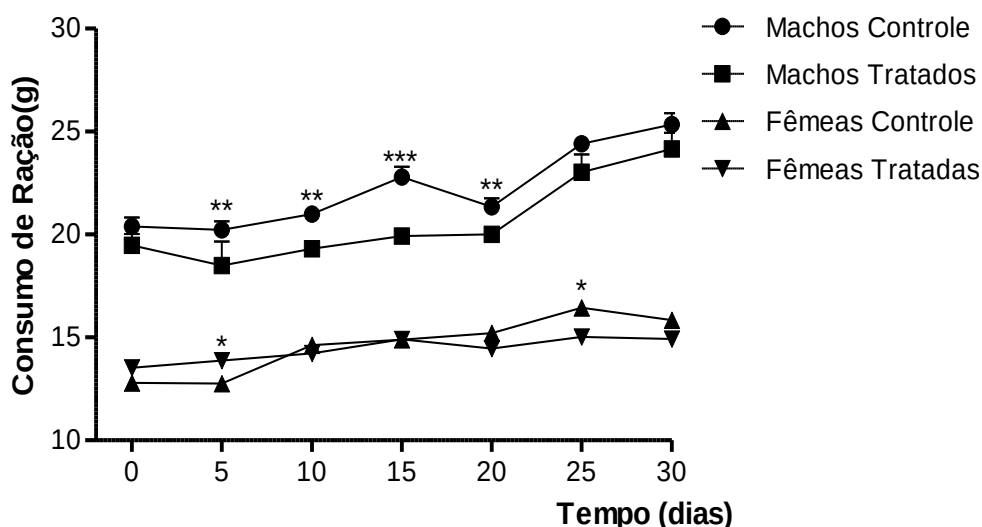


Figura 3. Efeito do tratamento diário por via oral com EBHACb (500 mg/kg) sobre o consumo de ração (g) de ratos machos e fêmeas no período de 30 dias. O grupo controle foi tratado com água destilada (0,5 mL/animal). Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=5), sendo que *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 representam resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

O sangue é um importante indicador do estado fisiológico e patológico dos homens e animais (ODUOLA et al., 2007), sendo que seus valores podem ser alterados pela ingestão de substâncias tóxicas, inclusive plantas e outros produtos naturais (VAZQUEZ; GUERRERO, 2007). Os parâmetros bioquímicos são importantes porque eles permitem a avaliação de vários órgãos e o estado geral do corpo do animal, principalmente no que tange os rins e a função renal (SILVA, 2012).

Dos parâmetros analisados três tiveram diferenças estatísticas significativas: Fosfatase alcalina, Proteína Total e triglicérides (Tabela 2), sendo que somente a primeira estava fora da faixa de referência utilizada (CLIFFORD; GIKNIS, 2008; MELO et al., 2012).

A fosfatase alcalina (FA) sérica tem grande significado clínico na investigação das desordens hepatobiliares e ósseas. Nas enfermidades hepatobiliares, as elevações da atividade da enzima são encontradas, principalmente na obstrução extrahepática (RANG et al., 2007).

Neste caso, a atividade da FA se eleva devido ao incremento na síntese da enzima, induzida pela colestase (HENRY, 2008). Como o aumento dos níveis séricos de FA não foi acompanhada por outros parâmetros bioquímicos relacionados a função hepática, como as transaminases AST e ALT, tal aumento não tem significado clínico podendo essas alterações estarem relacionadas à variabilidade biológica entre os sexos.

Tabela 2. Efeito da administração diária do EBHACb por via oral sobre os parâmetros bioquímicos realizados com o sangue dos ratos machos e fêmeas tratados por um período de 30 dias.

SEXO	FÊMEAS		MACHOS	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Albumina (g/l)	3.84 ± 0.05	3.94 ± 0.04	3.9 ± 0.05	3.92 ± 0.07
Ácido Úrico (mg/dl)	1.28±0.12	0.84±0.11	1.12±0.25	1.02±0.08
Bilirrubina Total (mg/dl)	0.06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00
Bilirrubina Direta (mg/dl)	0.04±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.04±0.00
Colesterol Total (mg/dl)	56.4 ± 1.28	58.5 ± 7.43	54.4 ± 5.5	63.4 ± 10.3
Creatina (mg/dl)	0,44 ± 0,01	0.46 ± 0,10	0.5 ± 0,00	0.47 ± 0,02
Fosfatase alcalina (U/l)	82.6±16.1	175.4±14.8*	94.5±17.1	139.4±5.83
Gama GT	2.4±0.24	2.5±0.38	2.24±0.48	2.24±0.48
Glicose (mg/dl)	131.4 ± 7.44	136 ± 3.97	127±8.5	129.2 ± 5.6
Proteínas Totais (g/dl)	6.86±0.05	7.38±0.09	7.06±0.15	6.98±0.18
Aspartato Aminotransferase (U/l)	123 ± 9.14	125.4 ± 20.4	117.6 ± 11.5	114 ± 11.9
Alanina aminotransferases (U/l)	49.6 ± 4.7	46.6 ± 5.6	42.6 ± 5.5	47.4 ± 3.2
Triglicérides (mg/dl)	89.2 ± 6.8	154.6 ± 8.00*	120.4 ± 16.9	84.4 ± 9.71
Uréia (mg/dl)	45 ± 3.14	48.4 ± 2.4	46.8 ± 2.47	47.3 ± 4.76

Grupo Controle tratado diariamente com água destilada (0,5 mL/ animal), e Grupo Tratado com administrações diárias de EBHACb (500 mg/kg). Os dados representam a Média ± Desvio Padrão (n=5), sendo que *p<0,05 representa resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

Em estudos de toxicidade aguda e sub-aguda realizados com o extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum*, Cunha et al. (2009) constatou um aumento da FA dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, apesar de não haver nenhuma diferença significativa relacionada a massa corporal dos animais, hábitos fisiológicos diários, massa dos órgãos dos animais ou aos demais parâmetros laboratoriais. Assim, o autor concluiu que esta alteração não teve significância clínica.

Em relação aos parâmetros hematológicos (Tabela 3), a RBC, o MCV, a RDW e a contagem de glóbulos brancos apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratado e controle para as fêmeas.

Tabela 3. Efeito da administração diária do EBHACb por via oral sobre os parâmetros hematológicos realizados com o sangue dos ratos machos e fêmeas tratados por um período de 30 dias.

SEXO	FÊMEAS		MACHOS	
	Controle	Tratado	Controle	Tratado
Parâmetros Hematológicos				
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6.68 $\pm$ 0.1	7,33 $\pm$ 0.3*	6,66 $\pm$ 0.3	7,38 $\pm$ 0.1
HGB (g/dL)	12.8 $\pm$ 0.3	13.4 $\pm$ 0.3	12.4 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 0.3
HCT (%)	38.7 $\pm$ 0.8	39.7 $\pm$ 0.7	38 $\pm$ 1.7	40.7 $\pm$ 0.9
MCV (fl)	58.0 $\pm$ 0.6	54,2 $\pm$ 0.2*	57.1 $\pm$ 0.5	55.1 $\pm$ 0.4*
MCH (pg)	19.1 $\pm$ 0.1	18.3 $\pm$ 0.1*	18.7 $\pm$ 0.1	18.6 $\pm$ 0.1
MCHC (g/dL)	33.0 $\pm$ 0.1	33.8 $\pm$ 0.1*	32.7 $\pm$ 0.2	32.9 $\pm$ 0.3
RDW (%)	15.8 $\pm$ 0.3	17.2 $\pm$ 0,0*	15.5 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 0.2*
PLT (K/uL)	596.2 $\pm$ 7.87	599.2 $\pm$ 24.5	481.4 $\pm$ 86.8	617.4 $\pm$ 18.4
MPV (fm^3)	5.0 $\pm$ 0.0	4.9 $\pm$ 0.0	5.2 $\pm$ 0,1	5.1 $\pm$ 0,0
PDW (%)	16.9 $\pm$ 0.1	17.1 $\pm$ 0,2	17.9 $\pm$ 0.3	17.7 $\pm$ 0.3
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.2 $\pm$ 0.9	4.6 $\pm$ 0.6	3.3 $\pm$ 0.4	6.2 $\pm$ 0.4*
Linfócitos (%)	78.7 $\pm$ 3.09	78.3 $\pm$ 0.43	69.4 $\pm$ 4.32	65.4 $\pm$ 5.14
Neutrófilos (%)	16.84 $\pm$ 2.99	17.7 $\pm$ 0.30	23.7 $\pm$ 3.87	29.76 $\pm$ 4.33
Monócitos (%)	0.369 $\pm$ 0.17	0.282 $\pm$ 0.26	0.84 $\pm$ 0.31	0.83 $\pm$ 0.44
Eosinófilos (%)	2.66 $\pm$ 0.39	2.64 $\pm$ 0.27	4.84 $\pm$ 1.04	2.41 $\pm$ 0.23
Basófilos (%)	1.35 $\pm$ 0.30	0.96 $\pm$ 0.12	0.99 $\pm$ 0.37	1.51 $\pm$ 0.31

Grupo Controle tratado diariamente com água destilada (0,5 mL/ animal), e Grupo Tratado com administrações diárias de EBHACb (500 mg/kg). Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=5), sendo que *p<0,05 representa resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

Entretanto, segundo a literatura consultada e os valores de referências utilizados, somente o RDW estava fora da faixa de referência (CLIFFORD; GIKNIS, 2008; MELO et al., 2012). Este é um índice que mede o coeficiente de variação da distribuição das hemácias, ou seja, é um indicativo do grau de anisocitose das hemácias expresso em porcentagem (GROTO, 2008).

A análise dos parâmetros sanguíneos é relevante para avaliar os riscos apresentados ao organismo pela utilização da substância. As mudanças nestes parâmetros demonstram alto valor preditivo para a toxicidade humana, quando os dados são convertidos a partir de estudos com animais (JESUS et al., 2012).

Baixas concentrações de hemoglobina, hemácias e hematócrito podem indicar anemia, hemorragia recente ou retenção de líquido, causando hemodiluição (GUYTON; HALL, 2008; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Já uma contagem diminuída de plaquetas (trombocitopenia) pode resultar de uma série de situações patológicas, como a destruição aumentada dessas células, devido ao uso de certas drogas, a desordens imunes, a coagulação vascular disseminada e até lesões mecânicas (DOGAN; TURKOGLU, 2008).

O diferencial de leucócitos é usado para avaliar a distribuição e a morfologia dos glóbulos brancos, fornecendo informações mais específicas sobre o sistema imune do que a contagem de leucócitos isoladamente (FAILACE, 2009). No entanto, as alterações apresentadas, nesse estudo, não comprometeram a fisiologia orgânica dos animais tratados.

A análise macroscópica dos órgãos (coração, pulmão, fígado, rins e baço) dos machos tratados diariamente com 500 mg/kg do EBHECb não apresentou qualquer alteração, não sendo encontrado resultados significativos quando comparado ao grupo controle do seu respectivo gênero (Tabela 4).

Entretanto, quando analisado os órgãos das fêmeas do grupo tratado, quando comparado ao grupo controle, observou-se que todos os órgãos analisados obtiveram resultados estatisticamente significativos (Tabela 4), onde o fígado desses animais alcançaram um peso duas vezes maior que os animais do grupo controle. Apesar deste achado, a análise macroscópica externa das vísceras não revelou nenhuma alteração.

Alterações no peso relativo dos órgãos analisados são indicativos de toxicidade sistêmica (GONZALEZ; SILVA, 2003; LAPA et al., 2004). Os órgãos-alvo em ordem de frequência de envolvimento em toxicidade sistêmica são o SNC, o sistema circulatório, o sistema hematopoiético e órgãos viscerais como o fígado, os rins e o pulmão (KLAASSEN; WATKINS, 2012).

Para Guyton e Hall (2008) o fígado é um órgão altamente vascularizado responsável pela biotransformação, metabolização, síntese e excreção de determinadas substâncias muitas vezes nocivas ao organismo.

A massa do fígado das fêmeas, somado a elevação da FA nos achados bioquímicos do sangue, pode indicar um possível efeito hepatotóxico do EBHECb. Esse efeito, no entanto, pode ser mínimo, tendo em vista que as principais enzimas indicativas de hepatotoxicidade, como as transaminases AST e ALT, não sofreram alterações significativas.

Tabela 4. Peso absoluto (g) e relativo (%) dos órgãos dos ratos machos e fêmeas tratados por um período de 30 dias com EBHECb por via oral.

SEXO	FÊMEAS				MACHOS			
Grupos	Controle	Δ	Tratado	Δ	Controle	Δ	Tratado	Δ
Baço	0.58 ± 0.03	0,2	0,71 ± 0.02*	0,2	0.64 ± 0.02	0,2	0,65 ± 0.04	0,2
Coração	0.64 ± 0.01	0,2	1.01 ± 0,08*	0,3	0.70 ± 0.04	0,2	0.85 ± 0,04	0,3
Fígado	7.73 ± 0.05	0,3	12.3 ± 0.5*	0,5	8.71 ± 0.44	0,3	9.91 ± 0.53	0,4
Pulmões	0.90 ± 0.03	0,3	1.23 ± 0.07*	0,5	0.95 ± 0.04	0,3	1.05 ± 0.08	0,4
Rins	1.30 ± 0.01	0,5	1.94 ± 0.06*	0,8	1.45 ± 0.10	0,5	1.74 ± 0.08	0,7

Grupo Controle tratado diariamente com água destilada (0,5 mL/ animal), e Grupo Tratado com administrações diárias de EBHACb (500 mg/kg). Os dados representam a Média ± Desvio Padrão (n=5), sendo que *p<0,05 representa resultados estatisticamente significativos, comparados entre o mesmo sexo, através do Teste t de Student pareado para duas amostras.

Ainda, segundo Guyton e Hall (2008), os rins constituem os principais órgãos de depuração de substâncias, que têm um grande fluxo sanguíneo, além de possuir uma ampla superfície de contato com os compostos no interior dos túbulos renais, e o baço é um importante órgão imunológico (GUYTON; HALL, 2008). Devido a isso estes órgãos são sensíveis à detecção de possíveis efeitos tóxicos sistêmicos de substâncias (GOMES, 2012).

Vários fatores podem ter influenciado para a identificação dessas alterações no organismo dos animais, dentre eles a dose utilizada, o tempo de exposição e a sensibilidade da espécie, sobretudo das fêmeas, aos efeitos nocivos do extrato em estudo.

Segundo Klaassen e Watkins (2012), significativas diferenças podem ocorrer entre indivíduos da mesma espécie na resposta a uma substância química devido a sutis diferenças genéticas que constituem o polimorfismo genético. Este mesmo autor ressalta ainda que essas diferenças podem ser responsáveis por reações idiossincráticas aos produtos químicos e por diferenças nas respostas tóxicas.

Resultado semelhante foi apresentado na avaliação toxicológica do extrato etanólico de *Synadenium umbrellatum*, que revelou infiltrado linfocítico no fígado de ratas (CUNHA et al., 2009). Assim, estes dados corroboram com a análise bioquímica, pois lesões nos hepatócitos são acompanhadas do aumento da FA e das transaminases AST e ALT, o que não foi evidenciado neste estudo.

O fígado é responsável pela metabolização de todos os xenobióticos ingeridos, além de regular o nível de glicose e das transaminases AST e ALT, sendo tais enzimas liberadas no sangue na ocorrência de dano à membrana do hepatócito, o que resulta em alterações em sua permeabilidade. Portanto, os níveis enzimáticos de AST e ALT podem ser utilizados para avaliar a função hepática (HILALY; ISRAILI; LYOUSSEI, 2004).

Estudos realizados por Assam et al. (2010) revelou um aumento nos níveis séricos das enzimas AST e ALT após o tratamento de animais com o extrato aquoso metanólico de *Sidarthombifolia L.* (Malvaceae), afirmando que esse resultado seria um forte indicativo de dano ao tecido hepático.

A AST é essencialmente mitocondrial e não é liberada tão rapidamente quanto a ALT, que é citoplasmática. A ALT é o indicador mais sensível de hepatotoxicidade do que a AST, pois enquanto a primeira é essencialmente hepática, a segunda também pode ser encontrada em altas concentrações em outros órgãos como rins, pulmões e coração (MOTTA, 2003).

A hepatomegalia pode ter várias causas como infecções, neoplasias, cirrose, distúrbios metabólicos genéticos, uso de fármacos ou toxinas que poderiam aumentar a proliferação celular hepática. Entretanto, a comparação com análises histopatológicas é de fundamental importância (AMACHER et al., 2005).

Entretanto, segundo os dados apresentados, caso tenha ocorrido algum efeito tóxico durante o período de tratamento, pode-se sugerir que esse efeito foi de caráter reversível. Algumas drogas, devido a sua composição química, podem causar alguns danos, principalmente aos órgãos relacionados a metabolização e excreção das substâncias nocivas ao organismo, como é o caso dos rins e do fígado.

Segundo Klaassen e Watkins (2012), devido a alta capacidade de regeneração do tecido hepático, a maioria das lesões causadas pelo efeito tóxico da droga são reversíveis, enquanto que as lesões do SNC são irreversíveis, devido a característica específica das suas células especializadas.

Assim, o que caracterizaria a lesão do SNC seria, principalmente, alterações no comportamento dos animais. Neste estudo, esses sinais foram avaliados de acordo com os protocolos utilizados por Almeida et al. (1999) e Mariz (2007), não sendo observadas nenhuma mudança comportamental nos animais que caracteriza-se lesão no SNC.

Janbaz, Saeed e Gilani (2002) evidenciaram em sua obra o efeito hepatotóxico do Paracetamol, uma droga amplamente utilizada pelo seu efeito farmacológico, porém causa alguns danos ao fígado. Assim, mesmo apresentando um certo grau de toxicidade, deve-se avaliar o risco-benefício da droga.

Oliveira et al. (2010), em seus estudos identificou uma série de alterações macroscópicas em órgãos como o fígado, baço, pulmão e coração das ratas expostas aos extratos de *Alternanthera tenella* e *Alpinia speciosa*, não apresentando resultados significativos quando realizados os estudos histopatológicos destes órgãos.

Apesar das diferenças nos pesos dos órgãos das fêmeas, o autor relata ainda que não houve mortes entre os animais avaliados, tanto machos quanto fêmeas, não sendo identificadas alterações comportamentais durante o experimento (OLIVEIRA et al., 2010).

Estes dados são de pouca relevância clínica e sugerem baixa toxicidade do extrato, uma vez que não houve comprometimento da saúde geral dos animais. Entretanto, não é aconselhável a total desconsideração tóxica desse produto sobre o organismo, sobretudo se tratando das fêmeas, merecendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de ação envolvidos.

Em relação a ação hipoglicemiante, várias são as metodologias utilizadas para a comprovação científica dos diversos produtos que apresentam esta atividade, tanto vegetais quanto sintéticos.

Dentre eles encontra-se a indução do DM através da administração do aloxano, um derivado da pirimidina que apresenta alta toxicidade para as células β -pancreáticas, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio que leva à destruição e disfunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, consequentemente induzindo a uma deficiência da produção de insulina (MARLES; FARNSWORTH, 1995; SZKUDELSKI, 2001).

Para a realização deste experimento optou-se em utilizar ratos devido a facilidade de manutenção e manuseio do mesmo. Além disso, os ratos possuem um sistema biológico similar ao organismo humano, desenvolvendo os sinais e sintomas equivalentes aos apresentados em pessoas com DM.

Os ratos induzidos com aloxano também apresentam semelhanças clínicas, laboratoriais e histopatológicas idênticas aos encontrados em uma

pessoa com DM, facilitando assim a identificação das consequências apresentadas pela doença (LERCO et al., 2003; MARTHA et al., 2000).

Estudos indicam que a glicemia normal em jejum de ratos é diferente da observada em humanos, variando de 100 a 130 mg/dL, enquanto em humanos normoglicêmicos está entre 70 e 99 mg/dL (JORGE et al., 2004; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). Desta forma, pesquisas que utilizam a indução do modelo de diabetes experimental com agentes químicos, consideram ratos diabéticos aqueles que apresentam glicemia acima de 300 mg/dL pelo fato da alimentação durante os experimentos ser *ad libitum* (ZANATTA et al., 2008).

Assim, para a realização da atividade hipoglicemiante do EBHACb, realizou-se a indução do DM por aloxano em 32 animais, dos quais 6 não ficaram diabéticos (18,7%) e 26 ficaram diabéticos com glicemia superior a 400 mg/dL (81,3%), destes 5 morreram até o sétimo dia de observação (15,6%) e 4 morreram durante os 30 dias de tratamento, sendo 2 animais do grupo tratado com insulina (6,2%) e 2 animais do grupo tratado com a água destilada (6,2%), totalizando 9 mortes de animais diabéticos (34,6%) durante esta atividade.

O que se pressupõe é que a morte de ratos durante os dias iniciais de indução, foi devido a grande liberação de insulina pré-formada das células beta-pancreáticas pela ação citotóxica do aloxano, pois este agente xenobiótico eleva subitamente a secreção de insulina em presença ou ausência de glicose, sendo esta liberação de insulina dependente de cálcio extracelular e associado com uma captação exacerbada através das ilhotas de Langerhans, o influxo de cálcio resulta na despolarização das células beta pancreáticas abrindo canais de cálcio voltagem-dependente (NUKATSUKA; SAKURAI; KAWADA, 1989).

Há também o processo de destruição rápida das células beta-pancreáticas por citotoxicidade do aloxano, via ação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), onde é formado radicais superóxidos. Esses radicais sofrem modificações para peróxido de hidrogênio e, logo depois, radicais hidroxilas altamente reativos, devido ao fato de células beta serem sensíveis ao stress oxidativo. O excesso de ROS causa disfunção dessas células lavando a destruição por necrose e liberando a insulina armazenada, culminando com a instalação do DM ou morte súbita (SAKURAI; OGISO, 1994; 1995; NUKATSUKA; SAKURAI; KAWADA, 1989).

Os outros animais mortos do grupo tratado com insulina provavelmente morreram de hipoglicemia devido as dificuldades apresentadas na administração da insulina, em relação a dose e à via de administração da droga. Os animais do grupo tratado com água destilada podem ter morrido por hiperglicemia severa, uma vez que os animais estavam sendo tratado com uma substância placebo, neste caso, água destilada.

Entretanto, apesar das perdas, os animais que morreram foram imediatamente substituídos durante as atividades para que não houvesse interferências durante o processo referente a realização das mensurações necessárias.

Portanto, podemos inferir que as mortes ocorridas durante as atividades podem ser consideradas excepcionais, pois em estudos relatados por Lerco et al. (2003), obtiveram 21,8% de mortalidade em animais não-diabéticos, 39% em animais diabéticos, e 39 % durante a primeira semana após a indução. Já nos estudos realizados por Cavalli et al. (2007), obtiveram 38,3% de animais que não ficaram diabéticos, 50% dos animais desenvolveram diabetes e houve apenas 6,7% de mortalidade.

A indução do DM por aloxano é muito variada como observar-se nos resultados acima. Esse modelo experimental sofre muitas influências durante o processo de indução, tais como a grande instabilidade da droga, via de administração, dose efetiva para a indução e estado nutricional da espécie animal usada para o modelo do DM (SZKUDELSKI, 2001).

Assim, os animais que constituíam o grupo diabético tratado com água destilada apresentaram os parâmetros clínicos e laboratoriais equivalentes aos parâmetros apresentados no diabetes grave.

Desta forma, os animais desenvolveram, ao longo do experimento, progressiva queda no estado geral, apresentando um estado de apatia, grande variação de massa corporal, alteração da pelagem e do turgor cutâneo, odor forte da urina, poliúria, polifagia, polidipsia e hiperglicemia.

Em contrapartida, os animais normoglicêmicos e os tratados com insulina apresentaram características laboratoriais e clínicas equivalentes, porém os animais tratados com EBHECb apresentaram características transitória entre o grupo tratado com água destilada e o grupo tratado com insulina.

A respeito dos parâmetros avaliados nos grupos experimentais foi possível observar que o tratamento promoveu uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,01$) na ingestão de ração (Figura 4), no grupo de animais tratado com o EBHECb a partir do 10º dia de tratamento quando comparado com o grupo tratado com água destilada.

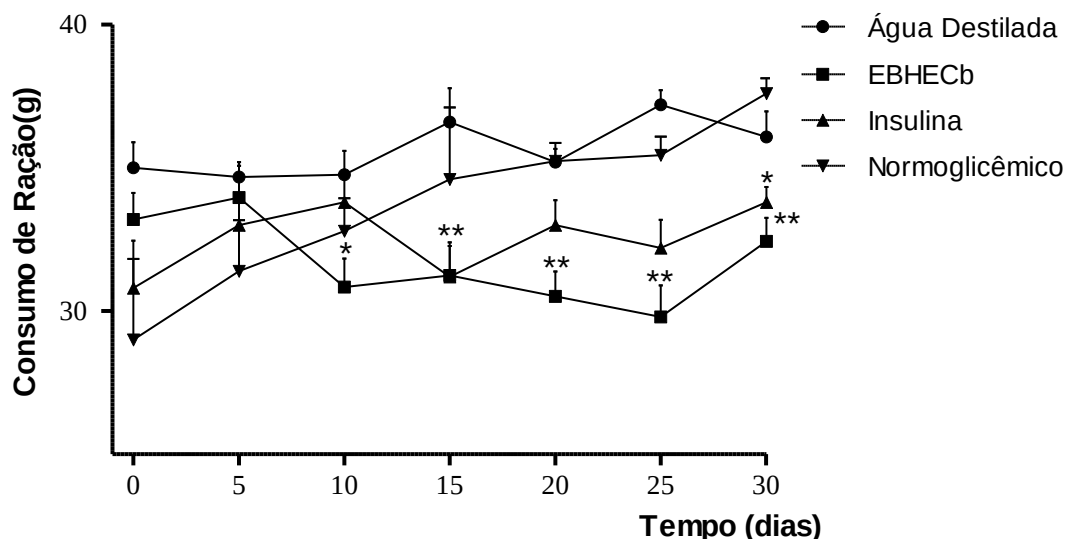


Figura 4. Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o consumo de ração (g) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias. Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão ($n=5$), sendo que * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo tratado com água destilada através do Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey para múltiplas comparações.

Observou-se também que o grupo normoglicêmico obteve um consumo de ração crescente e contínuo até o final do tratamento. O grupo tratado com a insulina, por sua vez, manteve-se crescente até o 10º dia, quando diminuiu consideravelmente o consumo de ração ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo tratado com água destilada, aumentando o consumo a partir do 20º dia de tratamento.

O grupo de animais diabéticos tratados com água destilada, demonstraram uma intensa polifagia, resultado da gravidade do diabetes adquirido por este, em relação aos demais grupos.

Isto se deve, possivelmente, a falta de insulina, pois a insulina estimula a liberação de leptina das células adiposas que penetram no SNC, onde pode diminuir a ingestão de alimentos ao afetar as ações do peptídeo neuropeptídeo Y- NPY em neurônios no núcleo arqueado do hipotálamo (CAMBRAIA, 2004; DAMIANI; DAMIANI; MENEZES FILHO, 2010; HALPERN, 2002).

Com a redução de insulina em diabéticos, assim como em pessoas em estado de jejum, há a redução de leptina e consequentemente resulta em um aumento da ingestão de alimentos (AIRES, 2008).

A polifagia também pode ser atribuída a distúrbios nos processos de regulação da fome pelo centro da saciedade, localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial-NHVM, que necessita de insulina para a captação de glicose, mediado por neurônios de vias dopaminérgicas e 5-Hidroxitriptaminérgicas, pois uma vez que a glicose é captada, o centro da fome é inibido (DAMIANI; DAMIANI; MENEZES FILHO, 2010; GUYTON; HALL, 2008).

Em situação como o diabetes, onde ocorre ausência de insulina, o NHVM não capta glicose e o centro da fome, portanto não é inibido. Esta área atua por *feedback*, pois uma vez não inibida, sinaliza falta de glicose, estimulando assim a vontade de ingerir alimentos (JACOBSON, 1996).

Esses processos podem também explicar a redução do consumo de alimentos no grupo dos animais diabéticos tratados com insulina no decorrer do tratamento, ou até mesmo a significativa redução do consumo de alimentos do grupo tratado com EBHECb em relação ao grupo tratado com água destilada.

Em relação ao desenvolvimento ponderal (Figura 5), observou-se que os animais normoglicêmicos, bem como aqueles tratados diariamente com insulina obtiveram um aumento crescente de peso até o final do tratamento, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo tratado com água destilada.

Os animais tratados com EBHECb mantiveram o peso ao longo de todo o tratamento, apresentando entre o 15º e o 30º dia uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo da água destilada.

O grupo de animais tratados com o EBHECb apresentou pouca variação de peso, mostrando que o tratamento possivelmente pode regular o peso evitando a perda de massa corporal.

A insulina é um hormônio que facilita o transporte de glicose para as células musculares e para os adipócitos, aumenta a síntese e armazenamento de proteínas celulares, de glicogênio no músculo e dos triglicerídeos nos adipócitos, além de diminuir o catabolismo proteico (MAY; BUSE, 1989).

A perda de peso que ocorreu no grupo de animais tratados com água destilada pode ter sido devido a falta de insulina que ocasiona intenso processo

de catabolismo de proteínas estruturais e beta oxidação de ácidos graxos, que por conseguinte reduzem a massa corporal dos indivíduos com DM tipo 1 não tratados (BERNE; LEVY, 2000; MOLINA et al., 1989; QUEIROZ et al., 2009).

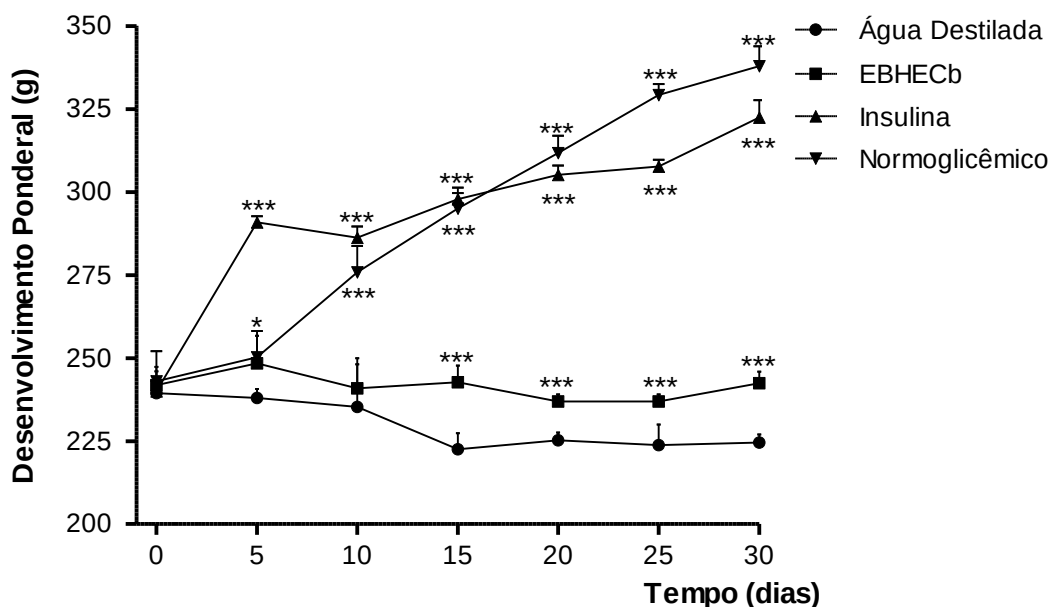


Figura 5. Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o desenvolvimento ponderal (g) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias. Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=5), sendo que * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo tratado com água destilada através do Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey para múltiplas comparações.

Isso ocorre por consequência da não captação de carboidratos pelas células para obtenção de energia, como o indivíduo necessita de energia para suprir suas necessidades fisiológicas, o organismo promove novas vias de obtenção de energia utilizando proteínas e ácidos graxos, assim influenciando diretamente na redução do peso corporal (BERNE; LEVY, 2000; MOLINA et al., 1989; QUEIROZ et al., 2009).

A perda de peso em indivíduos diabéticos pode levar a complicações, pois a dislipidemia representa um sério risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MOLINA et al., 1989; QUEIROZ et al., 2009; YADAV; MOORTHY; BAQUER, 2005). A doença cardiovascular é a principal responsável pela redução de sobrevida de pacientes diabéticos, sendo a causa mais frequente de mortalidade, pois engloba grande variedade de distúrbios vasculares, incluindo infarto do miocárdio (LEHTO et al., 1997).

A hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos adipócitos, contribui para a elevação de acetil-CoA que é precursora de corpos cetônicos no fígado

(FORETZ et al., 1999). Segundo o mesmo autor, o aumento nos níveis sanguíneos dos corpos cetônicos, acetoacetato e D-β-hidroxibutirato diminuem o pH sanguíneo, resultando em uma acidose (cetoacidose diabética), condição que pode provocar o coma, em casos extremos, e até evoluir para a morte.

O consumo hídrico é um outro fator fortemente influenciado pelo aumento plasmático de glicose onde, na ocorrência do DM, o indivíduo geralmente apresenta polidipsia. A Figura 6 nos mostra que os animais tratados com EBHECb e Insulina reduziram consideravelmente o consumo de água após os seus respectivos tratamentos, apresentando resultados estatisticamente significativos ($p < 0,001$) quando comparados aos animais tratados com água destilada.

O consumo hídrico pelos animais normoglicêmicos variou em média de 40 ± 4.6 mL/dia, com a indução do diabetes esse volume se elevou para 127 ± 7.8 mL/dia, o grupo tratado com EBHECb apresentou uma redução de 27 % (93 ± 6.3 mL/dia) em relação ao grupo tratado com água destilada, já o grupo tratado com insulina apresentou redução de 60% (53 ± 5.1 mL/dia), ficando com níveis de ingestão hídrica próximo do normal.

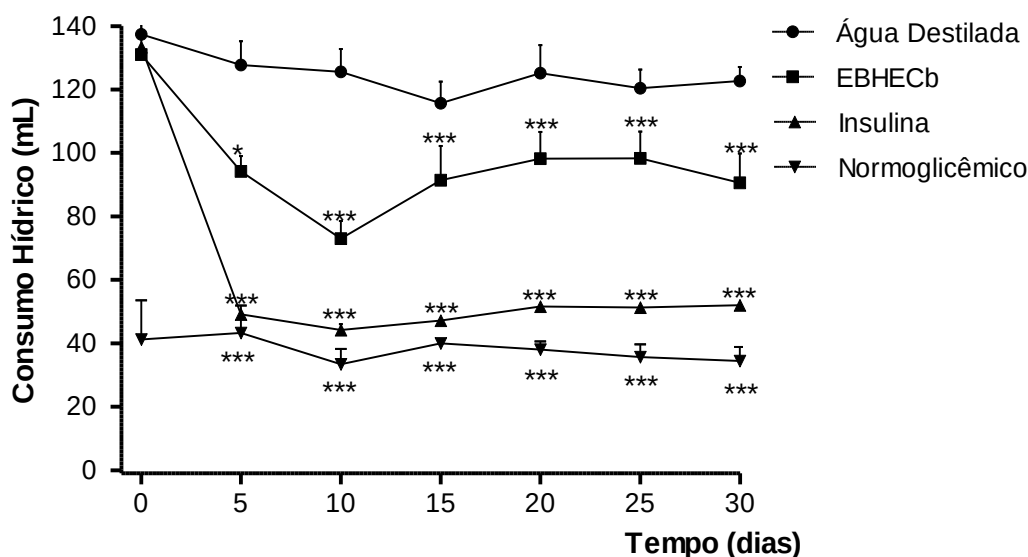


Figura 6. Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o consumo hídrico (mL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias. Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão ($n=5$), sendo que * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo tratado com água destilada através do Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey para comparações múltiplas.

A redução do consumo hídrico dos animais tratados com insulina e EBHECb foi devido a redução dos níveis plasmáticos de glicose, essa redução tornou-se proporcional para cada grupo de acordo com o estado glicêmico.

A polidipsia presente nos animais diabéticos ocorre devido à hiperosmolaridade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz com que a água passe do meio intracelular para o extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico (AIRES, 2008; BERNE, 2000).

A desidratação intracelular é reconhecida pelos osmorreceptores cerebrais que geram uma resposta desencadeando a sede intensa característica do diabetes (LERCO et al., 2003).

Esse processo também gera o mecanismo de homeostasia utilizado pelo organismo diabético, na tentativa de eliminar o excesso de glicose presente na circulação sanguínea. Essa eliminação é realizada principalmente pelos rins, através da urina, apresentando altos níveis de glicose na urina excretada (GUYTON; HALL, 2008).

Um outro fator que está presente na DM é a poliúria, referente ao aumento de excreção urinária recorrente do aumento de glicose na corrente sanguínea (AIRES, 2008).

Este fator foi evidenciado nas atividades experimentais (Figura 7), onde os animais tratados com água destilada apresentaram uma produção de aproximadamente 95.79 ± 6.4 mL de urina diariamente sendo esse volume 11,5 vezes maior que o grupo dos animais normoglicêmicos que mantiveram uma produção de volume urinário de aproximadamente 8.32 ± 4.1 mL.

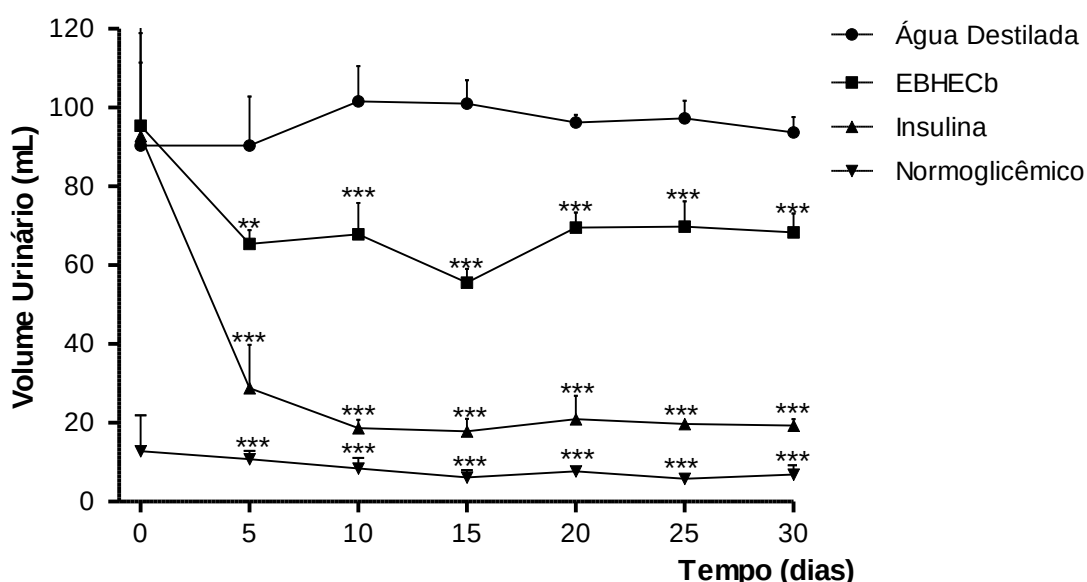


Figura 7. Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre o volume urinário (mL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias. Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão (n=5), sendo que **p<0,01 e ***p<0,001 apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo tratado com água destilada através do Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey para múltiplas comparações.

Os animais tratados com EBHECb apresentaram uma redução de 34,57 % em relação ao grupo tratado com água destilada, porém ainda demonstraram um aumento de aproximadamente 8 vezes o volume normal de urina.

O grupo tratado com insulina demonstrou uma média de volume urinário de $20,8 \pm 4$ mL, reduziu em 95,4 % os níveis de urina, então assim como o grupo normoglicêmico mantiveram valores estatisticamente significantes ($p < 0,001$) quando comparados aos animais tratados com água destilada.

Por conseguinte, quando maior a concentração de glicose plasmática maior é a absorção de seu equivalente isosmótico de água, onde o organismo busca sempre obter o equilíbrio osmótico nos diversos compartimentos celulares (AIRES, 2008; GUYTON; HALL, 2008). Assim, associado ao processo de polidipsia, o indivíduo diabético realiza grande quantidade de excreção urinária.

Em relação a glicosúria (Figura 8), observou-se que os animais diabéticos tratados com água destilada apresentaram uma média de $742,4 \pm 64,4$ quando comparado ao grupo normoglicêmico, que apresentou uma média de $6,7 \pm 2,2$ mg/dL de glicose na urina.

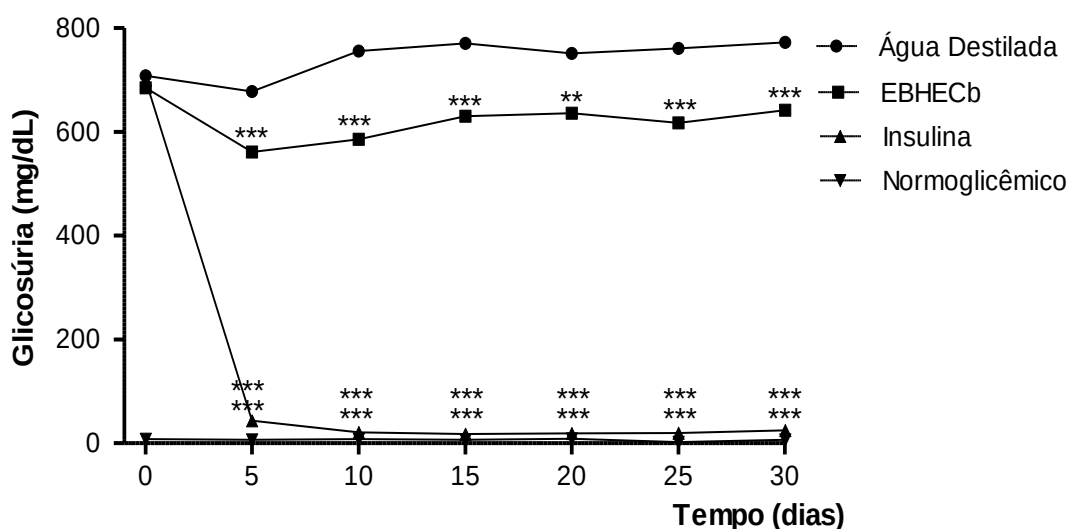


Figura 8. Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre a glicosúria (mg/dL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias. Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão ($n=5$), sendo que ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo tratado com água destilada através do Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey para múltiplas comparações.

Assim, conclui-se que houve um aumento de excreção de glicose pela urina altíssimo com mais de 110 vezes do grupo controle quando comparado ao grupo normoglicêmico.

Já o grupo tratado com EBHECb apresentou média de $595,08 \pm 26$ mg/dL de excreção de glicose com uma redução de aproximadamente 20% em relação

ao grupo tratado com água destilada, assim com significância de $p<0,001$ em todos os dias de mensuração.

O grupo tratado com insulina apresentou média de $20,4\pm2,5$ mg/dL sem significância estatística em relação ao grupo normoglicêmico, por sua vez, ambos grupos foram estatisticamente significativos ($p<0,001$) quando comparados aos animais tratados com água destilada.

Em relação a glicemia (Figura 9), observou-se que os animais tratados com água destilada apresentaram altos níveis, com média de $592,7\pm50,2$ quando comparados ao grupo normoglicêmico que apresentou uma média de $177,42\pm22,9$ mg/dL, com isso houve um aumento de glicose plasmática equivalente a aproximadamente 405 mg/dL.

Já o grupo tratado com EBHECb demonstrou significância estatística na redução dos níveis glicêmicos em relação a grupo tratado com água destilada ($p<0,01$ e $p<0,001$), com redução de 18 %.

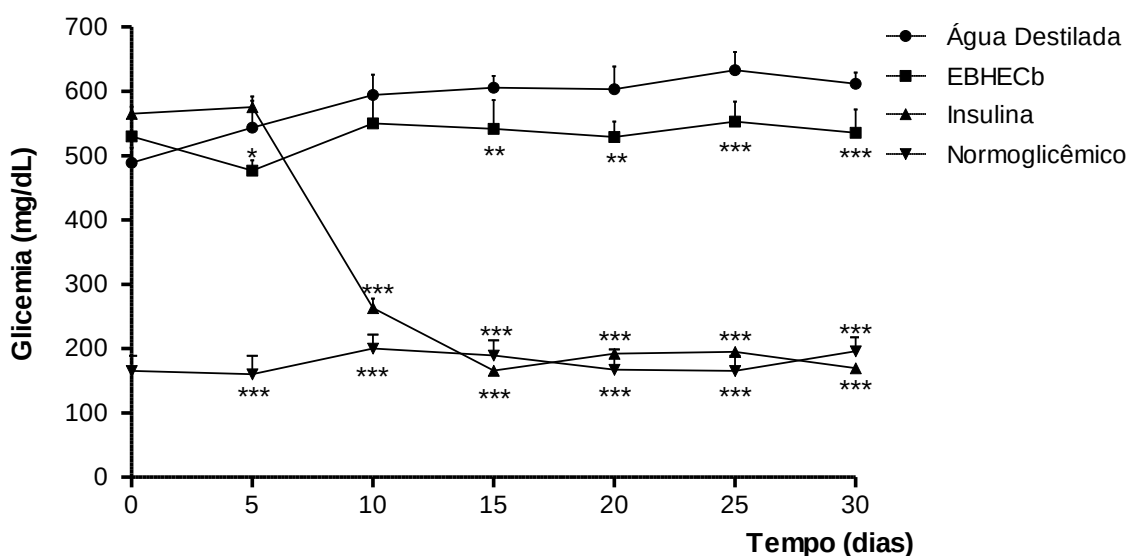


Figura 9. Efeito do tratamento com água destilada (0,5 mL/animal), EBHECb (500 mg/Kg), e Insulina NPH (8 UI/dia) sobre a glicemia (mg/dL) de animais diabéticos e de animais normoglicêmicos no período de 30 dias. Os dados representam a Média $\pm$ Desvio Padrão ($n=5$), sendo que * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ apresentaram resultados estatisticamente significativos, quando comparados ao grupo tratado com água destilada através do Teste ANOVA seguido do Teste de Tukey para múltiplas comparações.

O grupo tratado com insulina apresentou grande significância estatística quando comparados aos animais tratados com água destilada ($p<0,001$) e quando comparado ao grupo de animais normoglicêmicos não houve diferenças estatísticas.

Na atualidade há uma grande busca por agentes hipoglicemiantes que apresentem propriedades capazes de reduzir os sintomas causados pela

diabetes, com enfoque principalmente para as plantas medicinais usadas na medicina popular ou por comunidades tradicionais, pois dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; BARBOSA-FILHO et al., 2005).

Tem sido discutido na literatura que uma droga é considerada eficaz como anti-hiperglicemiante quando ela reduz os níveis de glicose plasmáticos em pelo menos 15 % dos valores iniciais (MARTHA et al., 2000). De acordo com esse critério podemos concluir que o tratamento com EBHECb em ratos com diabetes induzido por aloxano é eficaz, pois foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos em 18%, assim como atuar na redução de sintomas decorrentes do diabetes induzido por aloxano, tais como: polifagia, polidipsia e poliúria.

As plantas medicinais apresentam diversos mecanismos no controle do metabolismo de carboidratos, esses mecanismos reduzem a hiperglicemia por atuarem na restauração da integridade e função das células β -pancreáticas, aumentando a estimulação da liberação de insulina, promovendo melhora da captação e utilização da glicose e atuam reduzindo o dano oxidativo por ROS, assim fazendo das plantas um excelente alvo para o desenvolvimento de novos modelos terapêuticos (ROCHA et al., 2006).

Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa Fármacos da Universidade Federal do Amapá, como citado em Carvalho et al. (2013), o extrato da espécie *Calophyllum brasiliense* apresentou grande teor de compostos polifenólicos, sendo que essas substâncias naturais antioxidantes apresentam um grande potencial para a atividade hipoglicemiante como agentes terapêuticos.

A presença de taninos assim como a de flavonoides e outros fenólicos no extrato reforçam as propriedades hipoglicemiantes desta espécie, pois estes metabólitos secundários em vários estudos utilizando diversas espécies vegetais demonstraram tais atividades frente a indução de modelos diabéticos em diversas espécies de animais (SARTORI et al., 1999; BUFFON, 2005; SILVA et al., 2008; SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; SILVA et al., 2001).

A presença de flavonoides pode explicar o efeito hipoglicemiante, pois dentre as atividades farmacológicas atribuídas aos flavonóides estão a atividade hipoglicemiante, antioxidante, antiviral, antiinflamatória, antitumoral, sobre a

permeabilidade capilar e hormonal (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004; AHMAD *et al.*, 2000; DÔRES, 2007).

Os flavonóides dentre eles a rutina, podem estimular os efeitos da insulina nas células através do mecanismo de segundo mensageiro (por exemplo influenciando a proteína fosfofrutoquinase), e se ligar aos receptores de insulina, promovendo assim redução da glicemia (HAVSTEEN, 2002).

Alguns autores descrevem que plantas ricas em flavonóides são capazes de atuar na homeostasia da glicose, seja atuando como insulino-miméticos, secretagogos de insulina ou ambos (TROJAN-RODRIGUES *et al.*, 2012).

Em estudos feitos por Panda e Kar (2007), o extrato bruto e as frações da *Gentiana Olivieri* (Gentianaceae) e o flavonóide isolado, isoorientina, reduziram a glicemia de ratos normais hiperglicêmicos e diabéticos, após tratamento agudo por via oral.

O mecanismo de ação proposto para este composto envolveria a proteção das células beta pancreáticas do dano oxidativo e o aumento da secreção da insulina (PANDA; KAR, 2007). Além disso, atuaria também aumentando a sensibilidade dos tecidos periféricos em resposta à insulina (SEZIK *et al.*, 2005).

Estudos com outros flavonóides e seus glicosídeos demonstraram que estes compostos protegem as células beta pancreáticas e aumentam as concentrações plasmáticas de insulina por atuarem evitando o dano oxidativo, além de estimularem a liberação deste hormônio das células beta pancreáticas (LI *et al.*, 2007).

Silva e Cechinel Filho (2002) afirmam que os polifenóis existentes no extrato hidroalcoólico das sementes da *B. variegata* mostraram efeito hipoglicemiante em ratos com o diabetes induzido pela streptozotocina, onde demonstraram em seus estudos que o tratamento com o extrato hidroalcoólico (500 mg/kg) desta planta apresenta ação hipoglicemiante após 4 horas, maior que a insulina.

Neste mesmo estudo, foi confirmada também a ação antidiabética do chá das folhas secas de *B. monandra* (10%), o qual reduziu significativamente o nível glicêmico em camundongos (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Estudos realizados por Naik *et al.* (1991) sugerem que os taninos e triterpenos encontrado na quixabeira podem estar relacionados com a atividade hipoglicêmica desta planta. Assim, a partir do extrato etanólico das cascas e das

raízes desta planta obtém-se o ácido bássico, um triterpeno insaturado que promove o aumento dos níveis de insulina plasmática (NAIK et al., 1991).

Os estudos com plantas medicinais na busca por plantas com propriedades anti-hiperglicemiantes levaram a descoberta da planta *Galega officinalis*, que levou ao desenvolvimento da droga hipoglicemiante oral, da classe da biguanidas a Metformina (NOEL et al., 1997).

Assim, outros mecanismos sugeridos para a redução da glicemia do extrato utilizado neste estudo pode ter sido através do aumento no número e na sensibilidade dos sítios receptores de insulina, redução da gliconeogênese, redução da absorção gastrintestinal de glicose e/ou redução da liberação de glucagon (NEGRI, 2005; PEPATO et al., 2003). Pois drogas como as biguanidas orais, são capazes de alterar o metabolismo glicídico inibindo a elevação da glicemia pós-prandial em aproximadamente 25 a 30%.

Porém apesar destas suposições, não se pode afirmar qual o real mecanismo que promoveu a redução da glicemia e dos sinais clínicos da diabetes induzida por aloxanos, necessitando assim de estudos mais detalhados que possam elucidar e confirmar o mecanismo de ação inerente à esta droga vegetal.

5 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, aqui demonstrados e discutidos, referentes as avaliações toxicológica e hipoglicemiante do EBHECb, juntamente com o embasamento dos mecanismos já descritos na literatura, pode-se sugerir que a DL_{50} do EBHECb encontra-se superior a 2000 mg/kg, quando administrado em dose única por via oral, o qual não produziram mortalidade em 14 dias de observação após o tratamento dos animais.

O tratamento agudo com o EBHECb, nas doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg e 2000 mg/kg não influenciou sobre o desenvolvimento ponderal, e sobre o comportamento dos animais, não havendo sinais de toxidade geral.

A administração oral do EBHECb por 30 dias, na dose de 500 mg/kg, causou aumento do desenvolvimento ponderal e do consumo de água e ração sendo que essas alterações não possuem significado toxicológico.

Apesar de ter apresentado aumento significativo dos órgãos das fêmeas (baço, coração, fígado, pulmões, rins), o EBHECb não promoveu alterações significativas nos parâmetros sanguíneos dos animais, de acordo com os valores de referências utilizados, a não ser na fosfatase alcalina das fêmeas tratadas, sugerindo-se atividade toxica sistêmica leve com tratamento subagudo. Haja vista que os ratos machos tratados com a mesma dose não apresentaram alterações.

Vários fatores podem ter influenciado para a identificação dessas alterações no organismo dos animais, dentre eles a dose utilizada, o tempo de exposição e a sensibilidade da espécie, sobretudo das fêmeas, aos efeitos nocivos do extrato em estudo.

Considerando que houve alterações nos órgãos das fêmeas, tratadas por 30 dias com 500 mg/kg de EBHECb, sugere-se realização de estudos toxicológicos com análises histológicas dos órgãos dos animais, merecendo maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de ação envolvidos, sobretudo relacionado as fêmeas, devendo considerar essas alterações em estudos posteriores.

Além disso, sugere-se a realização de estudos relacionados a toxicologia reprodutiva, devido ao fato das alterações estarem presentes apenas nas fêmeas tratadas com o EBHECb, podendo apresentar dificuldades na reprodução ou no desenvolvimento do embrião.

Em relação a atividade hipoglicemiante, conclui-se que o EBHECb na dose de 500 mg/kg promove estabilidade no desenvolvimento ponderal dos animais, onde o grupo tratado apresentou pouca variação de peso quando comparado ao grupo tratado com a água destilada, demonstrando que o tratamento com o EBHECb, possivelmente, pode regular o peso evitando a perda de massa corporal.

Os animais (ratos) tratados com o EBHECb (500 mg/kg) também apresentaram redução considerável no consumo de água e, conseqüentemente, na produção de urina quando comparado ao grupo controle, controlando sintomas característicos da DM como a polidipsia e a poliúria, evidentes no grupo da água destilada.

O EBHECb também promoveu uma redução na eliminação de glicose pela urina (glicosúria) e na glicemia dos animais tratados, o qual foi capaz de reduzir os níveis glicêmicos em 18%.

Assim, conclui-se que o EBHECb foi capaz de reduzir os sinais decorrentes do DM induzido por aloxano como a perda de peso, a polidipsia, poliúria, polifagia, glicosúria e a hiperglicemia.

Pode-se sugerir que esse efeito seja decorrente da presença de metabolitos secundários como os taninos e os flavonoides, dentre eles a rutina e outros fenólicos, capazes de desenvolver atividades hipoglicemiantes como citados na literatura. Entretanto, faz-se necessário estudos que esclareçam o mecanismo de ação do EBHECb responsável pela sua atividade hipoglicemiante.

Desta forma, pode-se sugerir que o EBHECb, na dose de 500 mg/kg, pode ser utilizado como tratamento complementar, facilitando a adesão das pessoas com diabetes ao tratamento. Porém, sem abandonar o tratamento medicamentoso convencional.

REFERÊNCIAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; OKABE, H.; AKAHANE, H.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; HUERTA-REYES, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal constituents in plants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 141-143, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. **Informe Técnico nº. 47, de 16 de novembro de 2011**. Esclarecimentos sobre a comercialização de *Aloe vera* (babosa) e suas avaliações de segurança realizadas na área de alimentos da ANVISA. Brasil, 2011. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/77d2e18049189cd6b929bd466b74119d/Microsoft+Word++Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+47+de+16+de+nove+mbro+de+2011.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 10 de jan. 2013.

_____. **Resolução RE nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasil, 2010.

_____. **Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004**: determina a publicação do "Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". Brasil, 2004.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, M. 1, p.114-140, 2007.

AHMAD, M.; AKHTAR, M. S.; MALIK, T.; GILANI, A. H. Hypoglycaemic action of the flavonoid fraction of *Cuminun nigrum* seeds. **Phytoterapy Research**, v.14, n. 2, p. 103-106, 2000.

AIRES, M. M. Fisiologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALARCON, A. F. J.; ROMAN, R. R.; PEREZ, G. S. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, n. 2, p.101-10, 1998.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, n. 3-4, p. 72-76, 1999.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina**: bases clínicas e farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones SRI, 1998.

AMACHER, E. D.; ADLER, R.; HERATH, A.; TOWNSEND, R. R. Use of proteomic methods to identify serum biomarkers associated with rat liver toxicity or hypertrophy. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1796-1803, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION-ADA. Standard of medical care in Diabetes-2011 (Position Statement). **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 11-61, 2011.

_____. **Medical management of type 1 diabetes**. 3ª ed. Virginia: ADA, 1998.

ASSAM, J. P. A.; DZOYEM, J. P.; PIEME, C. A.; PENLAP, V. B. *In vitro* antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n. 40, p. 1-7, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Resumo**. NBR-6028. São Paulo, 2003.

_____. **Citação de texto**. NBR-10520. São Paulo, 2001.

_____. **Trabalhos acadêmicos**. NBR 14724. São Paulo, 2001b.

_____. **Referências: elaboração**. NBR-6023. São Paulo, 2000.

_____. **Numeração progressiva das seções de um documento**. NBR-6024. São Paulo, 1989a.

_____. **Preparação da folha de rosto de livro**. NBR 10524. São Paulo, 1989b.

_____. **Sumário: procedimentos**. NBR-6027. São Paulo, 1989c.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F. M.; MODESTO-FILHO J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 392-413, 2005.

BENDAZZOLI, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **O Mundo da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 123-126, 2000.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. Fisiologia. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BERQUÓ, E. S. **Bioestatística**, São Paulo: EPU, 1981.

BEUTLER, H. P.; MAIER, E. M.; PETERS, G. B.; ROSSATO, C. K. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* em coelhos. *In: Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*. 35º COMBRAVET Gramado,

Rio Grande do Sul, 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0209-1.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BOTTENBERG, M. M.; WALL, G. C.; HARVEY, R. L.; HABIB, S. Oral *Aloe vera* induced hepatitis. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 41, n. 10, p. 1740-1743, 2007.

BRASIL, M. S. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

_____. Plano de reorganização da atenção a hipertensão arterial e ao diabetes mellitus. In: **Manual de hipertensão arterial e diabetes mellitus**. Secretaria de Políticas da Saúde. Departamento de ações programáticas e estratégicas. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

_____. Secretaria Vigilância Sanitária. **Portaria nº 116 de 08 de agosto de 1996**. Publica proposta de norma para estudo da toxicidade e eficácia de produtos fitoterápicos. Brasília, 1996.

_____. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, **Portaria SNVS nº 19 de 30 de janeiro de 1992**. Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno. In: "Boletim do Sobravime", v. 5, p. 2, 1992.

BRASIL. **Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009**. Dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Brasília, 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm. Acesso em: 02 de jun. 2012.

_____. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro 2008**. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília: 2008. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm >. Acesso em: 02 de jun. 2012.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaios Toxicológicos In Vivo**. Campinas: UNICAMP, 1994.

BUFFON, D. E. **Isolamento e identificação de princípios ativos de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae)**. 2005. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, São Paulo, 2005.

BURISCH, T. G.; BRADLEY, L. D. A. **Coping with chronic disease: research and applications**, New York: Academic Press, 1983.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

_____. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2003a.

_____. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003b.

CAMBRAIA, R. P. B. Aspectos psicobiológicos do comportamento alimentar. **Revista Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 217-225, 2004.

CANEPPELE, D. **Estudo químico de constituintes com potencial atividade antiúlcera da casca do caule de *Calophyllum brasiliense* Camb. (guanandi)**. Dissertação de Mestrado. 1998. 134 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 1998.

CAPASSO, R. Phytoterapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p.58-65, 2000.

CARLINI, E. A. Pesquisa com Plantas Brasileiras Usadas em Medicina Popular. *In: Medicamentos, drogas e saúde*. São Paulo: Hucitec, 1995.

CARVALHO, H. O.; MEDEIROS, B. J. L.; SÁ, B. M.; ARAÚJO, J. T. C.; KAWAKAMI, M. Y. M.; FAVACHO, H. A. S.; CARVALHO, J. C. T. Study of dissolution profiles and desintegration of capsules containing the dried hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 194-199, 2013.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil, **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86, n.1, p. 11-16, 2005a.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V.; KAPLAN, M. A. C. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 946–950, 2005.

CARVALHO, J. C. T. Considerações gerais sobre fitoterápicos. *In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V. **Fitoterápicos: nova opção terapêutica de antiinflamatórios (aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas)**. São Paulo: Tecmedd, 2003.

CARVALHO, J. E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M. **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas** vol. II. Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP: Campinas, 2001.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. 2001. 125 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001b.

CARVALHO, J. C. T. **Validação Química-Farmacológica da Espécie Vegetal *Pterodon emarginatus* Vog. (atividade anti-inflamatória)**. 1998. 184 f. Tese (Doutorado em Fármacos e Medicamentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.

CAVALLI, V. L. L. O.; SORDI, C.; TONINI, K.; GRANDO, A.; MUNERON, T.; GUIGI, A.; JÚNIOR, W. A. R. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) **Bernh. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2007.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CLIFFORD C. B; GIKNIS M. L. A. **Clinical Laboratory Parameter for Crl: WI (Han)**, 2008. Disponível em: <http://www.criver.com/files/pdfs/rms/wistarhan/rm_rm_r_wistar_han_clin_lab_parameters_08.aspx>. Acesso em: 03 jul. 2013.

CLOUATRE, D. L. Kava kava: examining new reports of toxicity. **Toxicology Letters**, v.150, n.1, p.85-96, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Brasília, 1991. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65>. Acesso em: 02 de jun. 2012.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA-CFMV. **Resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008**. Dispõe sobre o uso de animais no ensino e na pesquisa e regulamenta as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) no âmbito da Medicina Veterinária e da Zootecnia brasileiras e dá outras providências. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_879.pdf>. Acesso em: 02 de jun. 2012.

_____. **Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002.** Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.usp.br/bioterio/Artigos/Eutanasia/resolucao_714.pdf>. Acesso em: 02 de jun. 2012.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

COTTIGLIA, F.; DHANAPAL, B.; STICHER, O.; HEILMANN, J. New chromanone acids with antibacterial activity from *Calophyllum brasiliense*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 537-541, 2004.

CUNHA, L. C. Ç.; AZEREDO, F. S. Ç.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S. Ç.; PUCCI, L. L. Ç.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 403-411, 2009.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D.; MENEZES FILHO, H. C. Controle do apetite: mecanismos metabólicos e cognitivos. **Pediatria (São Paulo)**, v. 32, n. 3, p. 211-22, 2010.

DEBELLE, F. D.; NORTIER, J. L.; DE PREZ, E. G.; GARBAR, C. H.; VIENNE, A. R.; SALMON, I. J.; DESCHODT-LANCKMAN, M. M.; VANHERWEGHEM, J. L. Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.13, n. 2, p. 431-436, 2002.

DI CARLO, G.; BORRELI, F.; ERNST, E.; IZZO, A. A. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 6, p. 292-297, 2001.

DÔRES R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da Fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.).** Viçosa: UVF, 2007.

DOUGAN, S.; TURKOGLU, I. Iron-deficiency anemia detection from hematology parameters by using decision trees. **International Journal of Science & Technology**, v. 3, n. 1, p. 85-92, 2008.

DUNN, J. S.; SHEEHAN, H. L.; MACLEITCHIE, N. G. B. Necrosis of islets of langerhans produced experimentally. **Lancet**, v. 241, n. 6242, p. 484-487, 1943.

ELDER, C. Ayurveda for diabetes mellitus: a review of the biomedical literature. **Alternative Therapie Health Medicine**, v. 10, n.1, p. 44-50, 2004.

ELSNER, M.; TIEDGE, M.; GULDBAKKE, B.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. **Diabetologia**, vol. 45, n. 11, p. 1542-1549, 2002.

ERNST, E. Plants with hypoglycemic activity in humans. **Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 73-78, 1997.

ESLER, W. P.; RUDOLPH, J.; CLAUS, T. H.; TANG, W.; BARUCCI, N.; BROWN, S. E.; BULLOCK, W.; DALY, M.; DECARR, L.; LI, Y.; MILARDO, L.; MOLSTAD, D.; ZHU, J.; GARDELL, S. J.; LIVINGSTON, J. N.; SWEET, L. J. Small-molecule ghrelin receptor antagonists improve glucose tolerance, suppress appetite, and promote weight loss. **Endocrinology**, v. 148, n. 11, p. 5175-85, 2007.

FAILACE, R. **Hemograma**: manual de interpretação. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

FARDO, V. M.; CREUTZBERG, M.; SILVA, M. C. S. Qualidade de vida de idosos hospitalizados: um estudo preliminar. **Revista Nursing**, v. 86, n. 8, p. 314-319, 2005.

FERRAZ, A. E. P. **Modos de enfrentar problemas e sua relação com o componente emocional e controle metabólico das pessoas portadoras de diabetes mellitus**. 1995. 217 f. Tese (Doutorado em Enfermagem). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION-FDA. **Guidance for industry: M3(R2) nonclinical safety studies for the conduct of Human clinical trials for pharmaceuticals**, 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073246.pdf>>. Acesso em: 10 de jan. de 2013.

FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 1237-42, 1999.

GOMES, C. **Toxicidade subcrônica (28 dias) de *Tropaeolum majus* L. em ratos**. 73 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica animal**. UFRS, Porto Alegre. 2003.

GROSS, J. L.; FERREIRA, S. R. G.; FRANCO, L. J.; SCHMIDT, M. I.; MOTTA, D. G.; QUINTÃO, E. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 8-35, 2000.

GROTO, H. Z. W. Diferenciação das anemias microcíticas utilizando a determinação do RDW. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 2, 2008.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 81-100, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HALPERN, M. C. M. A. Aspectos fisiológicos do balanço energético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 3, p. 230-48, 2002.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S. Hypoglycemic plants: a review. **Fitoterapia**, v. 60, n. 3, p. 195-224, 1989.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HENNEY, J. E. Risk of drug interactions with St John's wort. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 13, p. 1679, 2000.

HENRY, J. B. **Diagnóstico clínico: tratamento por métodos laboratoriais**. 20^a ed. Manole: São Paulo, 2008.

HILALY, J. E.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Acute and chonic toxicological studies of Ajuga iva in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 43-50, 2004.

HOU, C. C.; LIN, S. J.; CHENG, J. T.; HSU, F. L. Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 5, p. 625-629, 2003.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibitory compounds from *Calophyllum brasiliense* leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 9, p. 1471-1475, 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION-IDF. **Diabetes health economics: facts, figures and forecasts**. Brussels: IDF, 1999.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y.; CECHINEL-FILHO, V.; ENIO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*. 2. Structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 368-371, 2003.

IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water-for life. **The Journal of the Norwegian Medical Association**, v. 123, n. 23, p. 3402-3405, 2003.

IVORRA, M. D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 27, n. 3, p. 243-275, 1989.

JACOBSON, A. M. Current concepts: the psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal Medicine**, v. 334, p. 1249-1253, 1996.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol and CCL₄ induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7-8, p. 557-563, 2002.

JEKEL, J.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999.

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.

JOHNS, T.; CHAPMAN, L. Phytochemicals ingested in traditional diets and medicine as modulators of energy metabolism. In: ARNASON, J. T.; MATA, R.; ROMEO, J. T. **Recent Advances in Phytochemistry**. New York: Plenum Press, 1995.

JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v.149, n. 2-3, p.89–96, 2004.

JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A. E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. 11, p. 2129-2139, 1969.

KANAT, O.; OZET, A.; ATAERGIN, S. Aloe vera-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man. **European Journal of Internal Medicine**, v. 17, n. 8, p. 589, 2006.

KAR, A.; CHAUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 1, p. 105-108, 2003.

KAR, A.; CHAUDHARY, B. K.; BANDYOPADHYAY, N. G. Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hypoglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 179-184, 1999.

KATSUMATA, K.; KATSUMATA, K. J. R.; KATSUMATA, Y. Protective effect of diltiazem hydrochloride on the occurrence of alloxan- or streptozotocin-induced diabetes in rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 24, n. 11, p. 508-510, 1992.

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

KONRAD, R. J.; MIKOLAENKO, I.; TOLAR, J. F.; LIU, K.; KUDLOW, J. E. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 1, p. 31-41, 2001.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2000.

LAMBA, S. S.; BUCH, K.Y.; LEWIS, H.; LAMBA, H. J. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 457- 495, 2000.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFSC/UFRS, 2004.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 4 ed. Editora Sarvier, 2007.

LEHTO, S.; RONNEMAA, T.; HAFFNER, S. M.; PYORALA, K.; KALLIO, V.; LAAKSO, M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1354-9, 1997.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocina induced diabetes. **Diabetology**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

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 por aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

LESSA, I.; POUSADA, J. M. D. C. Qualidade da Assistência Médica ao Diabético. **Arquivo Brasileiro de Medicina**, v. 62, n. 6, p. 459-63, 1988.

LI, W.; DAI, R. J.; YU, Y. H.; LI, L.; WU, C. M.; LUAN, W. W.; MENG, W. W.; ZHANG, X. S.; DENG, Y. L. Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1123-1129, 2007.

LIMA, C. S.; MEDEIROS, B. J. L.; FAVACHO, H. A. S.; SANTOS, K. C.; OLIVEIRA, B. R.; TAGLIALEGNA, J. C.; COSTA, E. V. M.; CAMOS, K. J.; CARVALHO, J. C. T. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 1013-1023, 2011.

LIMA, D. R. **Manual de farmacologia clínica, terapêutica e toxocologia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2004.

LIMA, S. R. M.; VEIGA-JR, V. F.; CHRISTO, H. B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1048-1053, 2003.

LIMA E. F; BARAGÃO G. B.; MORAES, M. P. L.; SOUSA JUNIOR, P. T. Estudos químicos dos constituintes farmacologicamente ativos da casca do caule da *Calophyllum brasiliense* (guanandi). **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. Cuiabá, 1994.

LINO, C. S.; DIOGENES, J. P.; PEREIRA, B. A.; FARIA, R. A.; ANDRADE-NETO, M.; ALVES, R. S.; QUEIROZ, M. G. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 1, p. 125-127, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: exóticas e cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiological Reviews**, v. 28, n. 3, p. 304-330, 1948.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C; JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARIZ, S. R. **Estudo toxicológico pré-clínico de *Jatropha gossypifolia* L.** 186 f. 2007. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Review Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 137-189, 1995.

MARTHA, R. C. D.; POUBEL, J.; FERREIRA, L. C. L.; LIMA, R. S.; BORRAS, M. R. L.; COSTA, P. R. C.; ROLAND, I. Atividade hipoglicêmica de *Averrhoa carambola* L. usada em Manaus como antidiabético. **NewsLab**, v. 38: 142-148, 2000.

MARTINS, J. J.; ALBUQUERQUE, G. L.; NASCIMENTO, E. R. P.; BARRA, D. C. C.; SOUZA, W. G. A.; PACHECO, W. N. S. Necessidades de educação em saúde dos cuidadores de pessoas idosas no domicílio. **Revista Texto Contexto Enfermagem**, v. 16, n. 2, p. 254-62, 2007.

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D.C.; DIAS, J. E. Buscando a Saúde por meio das Plantas Medicinais. In: **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, 2000.

MAY, M. E.; BUSE, M. G. Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. **Diabetes / Metabolism Reviews**, v. 5, n. 3, p.227-245, 1989.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. S.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais diabéticos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061-1065, 2003.

McCUNE, L. M.; JOHNS, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by indigenous peoples of the North American Boreal Forest. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 2-3, p. 197-205, 2002.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI M. R.; ARAÚJO A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, 2012.

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

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.11, p. 21-35, 2001.

MESÍA-VELA, S.; SANCHEZ, R. I.; ESTRADA-MUÑOZ, E.; ALAVEZ-SOLANO, D.; TORRES-SOSA, C.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; KAUFFMAM, F. C. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases, SULT 1A1 and SULT 2A1. **Review Phytomedicine**, v. 8, n. 6, p. 481-488, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Clarendon, 1950.

MIETLICKI, E. G.; DANIELS, D. Ghrelin reduces hypertonic saline intake under a variety of natriorexigenic conditions. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 10, p. 1072-83, 2011.

MIRANDA, R. C. M.; WANDERLEY, T. K. V.; MOURA, W.; ARAÚJO, J. M. Atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera* spp.) de diferentes procedências. *In: Anais do 16 Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Recife, p. 223, 2000.

MOLINA PIOLI, D. M. L.; ANGELELI, A. Y. O.; MACEDO, A. R.; BURINI, R. C. Efeito da insulina sobre o catabolismo das proteínas musculares, estudo *in vitro* da composição nitrogenada e da atividade das proteases ácidas lisossômicas. *Alimento e Nutrição*, v. 1, n. 1, p. 127-140, 1989.

MOORE, L. B.; GOODWIN, B.; JONES, S. A.; WISELY, G. B.; SERABJIT-SINGH, C. J.; WILLSON, T. M.; COLLINS, J. L.; KIEWER, S. A. St. John's Wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane x receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7500-7502, 2000.

MOTTA, T. V. **Bioquímica clínica para laboratório**: princípios e interpretações. São Paulo: Medica Missau, 2003.

MUNDO, S. R. **Caracteres morfoanatômicos de folhas e caule de espécies brasileiras de uso medicinal**: *Calophyllum brasiliense* Cambess. (Clusiaceae), *Cupania vernalis* Cambess. (Sapindaceae) e *Lafoensia pacari* A. ST.-HIL. (Lythraceae). 2007. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

NAIK, S. R.; BARBOSA FILHO, J. M.; DHULEY, J. N.; DESHMUKH, V. Probable mechanism of hypoglycemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 1-2, p. 37-44, 1991.

NAVARRO MOLL, M. C. Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care Espana**, v.2, n. 2, p.9-19, 2000.

NEEF, H.; DECLERCQ, P.; LAEKEMAN, G. Hypoglycaemic activity of selected European plants. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 1995.

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

NEVES, S. M. P.; PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A.; FONTES, R. S.; SANTANA, R. O. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da Faculdade de Farmácia-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013. Disponível em: <<http://interactivepdf.uniflip.com/2/81637/296210/pub/index.html>>. Acesso em: 02 de jun. 2012.

NEWBERN, V. B.; COLLIER, J. A. H. Foreword. **Holistic Nursing Practice**, v. 5, n. 1, p. 7-8, 1990.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. *In*: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuições e ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALE, 2003.

NOEL, P. H.; PUGH, J. A.; LARME, A.C.; MARSH, G. The use of traditional plant medicines for non-insulin-dependent diabetes mellitus in south Texas. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 7, p. 512-517, 1997.

NOVAES, A. P.; ROSSI, C.; POFFO, C.; PRETTI JÚNIOR, E.; OLIVEIRA, A. E.; SCHLEMPER, V.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; BÜRGER, C. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. **Therapie**, v. 56, n. 4, p. 427- 430, 2001.

NUKATSUKA, M.; SAKURAI, H.; KAWADA, J. Generation of alloxan free radicals in chemical and biological systems: implication in the diabetogenic action of alloxan. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.165, n. 1, p. 278-83, 1989.

ODUOLA, T.; ADENIYI, F. A. A.; OGUNYEMI, E. O.; BELLO, I. S.; IDOWU, T. O.; SUBAIR, H. G. Toxicity studies on an un ripe *Carica papaya* aqueous extract: biochemical and haematological effects in Wistar albino rats. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 1, n. 1, p. 001-4, 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals nº 401: Acute Oral Toxicity. Section 4. Paris: OECD Publishing, 1987. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/udpProc/udpfin01/append/Appendix4.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

_____. Guidelines for the Testing of Chemicals nº420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Section 4. Paris: OECD Publishing, 2001a. Disponível em:<http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

_____. Guidelines for the Testing of Chemicals nº423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Section 4. Paris: OECD Publishing, 2001b. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2014.

_____. Series on testing and assessment nº 24: Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Paris: OECD Publishing, 2002. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD-GD24.pdf>>. Acesso em: 30 jan. 2014.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OJEWOLE, J. A. O. Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* (willd) Hook methanolic root extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 231-237, 2002.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARAES, A. L.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. S.; REIS, S. A. G. B; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

OLIVEIRA, L. M. G.; SILVA, L. N. M.; FREITAS, M. R. F.; PEREIRA, M. C. M.; COSTA, R. M. **Avaliação da toxicidade aguda dos extratos etanólicos de *Alpinia speciosa* (Blume) D. Dietr.; *Alternanthera tenella* Colla; *Cassia tora* L.; *Eclipta alba* (L.) Hassk., *Hydrocotyle umbellata* L. e *Melia azedarach* L.** Curso de Especialização em Fitoterapia (Trabalho de Conclusão de Curso). Faculdade de Fáfarmacia da Universidade Federal de Goiás. 2010.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2-4, n. 1, p. 137-189, 1995.

OLIVEIRA, J. C. Propriedades farmacológicas gerais do *Calophyllum brasiliense* Camb (guanandi). In: **Anais do 13º Simpósio de Plantas Medicinai**s do Brasil. XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Fortaleza, 1994.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS-ONU. **Declaração Universal dos Direitos dos Animais-Unesco-ONU**. Proclamada pela UNESCO em sessão realizada em Bruxelas, em 27 de janeiro de 1978. Bélgica, 1978. Disponível em: <http://www.forumnacional.com.br/declaracao_universal_dos_direitos_dos_animais.pdf>. Acesso em: 02 de jun. 2012.

PAIVA, L. A. F., GURGEL, L. A., SILVA, R. M., TOME, A. R., GRAMOSA, N. V., SILVEIRA, E. R. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, p. 303–307, 2003.

PAIVA, L. A. F.; RAO, V. S. N.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 73–78, 1998.

PANDA, S.; KAR, A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxaninduced diabetic mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, p. 1543-1548, 2007.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocina diabetic rats. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v.37, n. 1, p.15-20, 2003.

PEREIRA, N. A. Plants as hypoglycemic agents. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5-6, p. 354-358, 1997.

PEREIRA, M. O. S.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Constituintes xantônicos do *Calophyllum brasiliense*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, n. 3-4, p. 425-427, 1966.

PRESTA, G. A.; PEREIRA, N. A. Atividade do Abagerú (*Chrysobalanus icaco* L, Chrysobalanaceae) em modelos experimentais para o estudo de plantas hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 68, n. 1, p. 91-101, 1987.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. 2005. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina, 2005.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA, F. B. Controle da adipogênese por ácidos graxos Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabolismo, v. 54, n. 5, p. 582-94, 2009.

RAHMAN, A. U.; ZAMAN, K. Medicinal plants with hypoglycemic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 1- 55, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. Rang & Dale Farmacologia. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, n. 1, p.603-613, 2000.

RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. Projeto madeira de Santa Catarina. **Sellowia**, v. 28, n. 1, p. 218-224, 1978.

REYES-CHILPA, R.; BAGGIO, C. H.; ALAVEZ-SOLANO, D.; ESTRADAMUÑIZ, E.; KAUFFMAN, F. C.; SANCHEZ, R. I.; MESÍA-VELA, S. Inibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthones isolated from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 167-172, 2006.

ROCHA, F. D., TEIXEIRA, V. L., PEREIRA, R. C., KAPLAN, M. A. C. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 2, p. 49-54, 2006.

RODE, D. Comfrey toxicity revisited. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 497-499, 2002.

SACKS, D. B. Carbohydrates. *In*: BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R., BRUNS, D. E. **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostic**. 4^a ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2006.

SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 251-265, 2002.

SAKURAI, K.; OGISO, T. Effect of ferritin on DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPHcytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 2, p. 262-266, 1995.

SAKURAI, K.; OGISO, T. Generation of alloxan radical in rat islet cells participation of NADPH cytochromo P-450 reductase. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 11, p.1451-1455, 1994.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA-JR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277–281, 2008.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 29-36, 2003.

SARTORI, N. T.; CANEPELLE, D.; SOUSA-JÚNIOR., P. T.; MARTINS, D. T. O. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 149-156, 1999.

SAXENA, A.; VIKRAM, N. K. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 10, n. 2, p. 369-378, 2004.

SCARANO, F. R.; RIBEIRO, K. T., MORAES, L. F. D.; LIMA, H. C. Plant establishment on flooded and unflooded patches of a freshwater swamp forest in Southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 14, n. 1, p. 793-803, 1997.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. Plantas Medicinais, Fitomedicamentos e Fitoterapia. *In: Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. Barueri: Mande, 2002.

SEEF, L. B. Herbal Hepatotoxicity. **Clinical in liver disease**, v. 11, n.3, p. 577-596, 2007.

SEZIK, E.; ASLAN, M.; YESILADA, E.; ITO, S. Hypoglycemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. **Life Sciences**, v. 76, n. 11, p. 1223-38, 2005.

SILVA, S. N.; ABREU, I. C.; SILVA, G. F. C.; RIBEIRO, R. M.; LOPES, A. S.; CARTAGENES, M. S. S.; FREIRE, S. M. F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. R. The toxicity evaluation of *Syzygium cumini* leaves in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 102-108, 2012.

SILVA, I. M.; PEIXOTO, A. L. O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 325-32, 2009.

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.com**, v. 4, n. 1, p.10-18, 2008.

SILVA, K. E. **Jacareúba (*Calophyllum brasiliense* Cambess.)**. Informativo técnico rede de sementes da Amazônia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, v. 11, 2005. Disponível em: <https://www.inpa.gov.br/sementes/iT/11_Jacareuba.pdf>. Acesso em: 23 fev. 2012.

SILVA, E. J. R.; AGUIAR, F. J. S.; GONÇALVES, E. S.; SOUSA, I. M. V.; DIMECH, G. S.; FRAGA, M. C. C. A.; COELHO, M. C. O. C.; WANDERLEY, A. G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 88-93, 2005b.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. *In: Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo: Tecmedd, 2004.

SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 449-454, 2002.

SILVA, K. L.; SANTOS, A. R. S.; MATOS, P. E. O.; YUNES, R. A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense*. **Therapie**, v. 56, n. 4, p. 431-434, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFSC/UFRS, 2004.

SIMÕES, C. M. O. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: UFSC, 1988.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO FARMACOLÓGICAS-SINITOX. **Casos de intoxicação e/ou envenenamento no Brasil em 2009**. Brasil, 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=349>. Acesso em: 10 de jan. de 2013.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Tratado de Enfermagem Médico cirúrgica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 3.

SOARES, J. C. M., COSTA, S. T., CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com diabetes mellitus aloxano induzido tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 113-18, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES – SBD. **Atualização Brasileira sobre Diabetes**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006.

SOSSAI, P.; NASONE, C.; CANTALAMESSA, F. Are herbs always good for you? A case of paralytic ileum using a herbal tisane. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 587-588, 2007.

STEVENS, K. R.; MYLECRAINE, L. Issues in chronic toxicology. *In*: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 3ª ed. New York: Raven Press, 1994.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutrition**. v.3, n.4, p.501-8, 2000.

SYIEM, D.; SYNGAI, G.; KHUP, P. Z.; KHONGWIR, B. S.; KHARBULI, B.; KAYANG, H. H. Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L. in normal and alloxan- induced diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1-2, p. 55-61, 2002.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pâncreas. **Physiology Research**, v. 50, n. 6, p. 536-546, 2001.

SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. Alloxan in vivo does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. **Physiological Research**, v. 47, n. 5, p. 343-346, 1998.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A 90 day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D, L-methylphenidate in Sprague dawley rats. **Toxicology**, v. 179, p. 183-96, 2002.

TINCUSI, B. M.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; MOUJIR, L. M.; MAMANI, Z. A.; BARROSO, J. P. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, p. 808–812, 2002.

TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 155-163, 2012.

UGAZ, O. L. **Investigación Fitoquímica**. Pontificia Universidad Católica del Peru, Lima, Peru: Fondo Editorial, 1994.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 93-98, 2006.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: Museu Paranaense Emílio Goeldi, 1993.

VÁZQUEZ, G. R.; GUERRERO, G. A. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Tissue & Cell**, v. 39, n. 3, p. 151-160, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUTI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 476-480, 2001.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 9-15, 2000.

VITAL, F. A. C.; MELO, S. J.; SILVA, T. G.; CARNEIRO, S.; ARAÚJO, J. M.; MENDONÇA-JR, F. J. B. Avaliação da toxicidade aguda e das atividades citotóxica, antimicrobiana e antiinflamatória de 7-*aril*-2,3-diidro α -tiazolo[3,2- α] pirimidin-5-ona-6-carbonitrila. **Latin American Journal Pharmacy**, v. 28, p. 507-512, 2009.

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

WAYNFORTH, B. H. **Experimental and surgical techniques in the rat**. London: Academic Press, 1980.

WHITTON, P. A.; LAU, A.; SALISBURY, A.; WHITEHOUSE, J.; EVANS, C. S. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v.64, n.3, p.673-9, 2003.

WILD, S. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p.1047-1053, 2004.

WOOLF, G. M.; PETROVIC, L. M.; ROJTER, S. E.; WAINWRIGHT, S.; VILLAMIL, F. G.; KATKOV, W. N.; MICHIELETTI, P.; WANLESS, I. R.; STERMITZ, F. R.; BECK, J. J.; VIERLING, J. M. Acute hepatitis associated with the Chinese herbal product Jin Bu Huan. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, n. 10, p. 729-735, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE-OMS. **Diabetes action now**: an initiative of the World Health Organization and the International Diabetes Federation. Switzerland: WHO, 2004.

_____. Bulletin of the World Health Organization: regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**. Geneva, 1998.

WREN, A. M.; SEAL, L. J.; COHEN, M. A.; BRYNES, A. E.; FROST, G. S.; MURPHY, K. G.; DHILLO, W. S.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 12, p. 5992, 2001.

WU, K. M.; GHANTOUS, H.; BIRNKRANT, D. B. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2606-2610, 2008.

XU, S.; LEVINE, M. Medical residents' and students' attitudes towards herbal medicines: a pilot study. **Canadian Journal of Clinical Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2008.

YADAV, U. C.; MOORTHY, K.; BAQUER, N. C. Combined treatment of sodium orthovanadate and *Mormodica charantia* fruit extract prevents alterations in lipid profile and lipogenic enzymes in alloxan diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 268, n. 1, p. 111–20, 2005.

YANG, H. N.; KIM, D. J.; KIM, Y. M.; KIM, B. H.; SOHN, K. M.; CHOI, M. J.; CHOI, Y. H. Aloe induced toxic hepatitis. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 3, p. 492-495, 2010.

YANG, Y. C.; YANG, J.; DOERGE, D. R.; CHAN, P. C.; FU, P. P.; CHOU, M. W. Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddeline, leading to DNA adduct formation *in vivo*. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 101-109, 2001.

YEONG, M. L.; CLARK, S. P.; WARING, J. M.; WILSON, R. D.; WAKEFIELD, S. J. The effects of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. **Pathology**, v. 23, n. 1, p. 35-38, 1991.

ZANATTA, L.; ROSO, A.; FOLADOR, P.; FIGUEIREDO, M. S. R. B.; PIZZOLATTI, M. G.; LEITE, L. D.; SILVA, F. R. M. B. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 4, p.532–535, 2008.

ZANOELLO, A. M.; MELAZZO-MAZZANTI, C.; KERPEL GINDRI, J.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 31-6, 2002.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; TSUZUKI, J. K.; BOEIRA, R.; DUTRA, A. L.; AKIMOTO, L.; KANESHIMA, E. N.; SILVA, J. C.; MARQUES, L. C. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo e sub-agudo) do produto Propovit Plus® em roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 265-72, 2002.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFSC/UFRS, 2004.

ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo no. 002A/2012 – CEP sobre “**Estudo pré-clínico do extrato hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (atividade hipoglicemiante)**”, sob a responsabilidade de **Benedito Junior Lima de Medeiros**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNIFAP, em reunião realizada em 06/08/2012.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 002A/2012 about **Estudo pré-clínico do extrato hidroetanólico de *Calophyllum brasiliense* Cambess (atividade hipoglicemiante)**”, **Benedito Junior Lima de Medeiros**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adapted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Research Ethical Committee (CEP-UNIFAP) in 06/08/2012.

Macapá, 06 de agosto de 2012


Prof. MSc. Alexandre Souto Santiago
Coordenador

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – Comitê de Ética em Pesquisa
Rod. JK km 2, Marco Zero CEP 68908-130 – Macapá – AP - Brasil
Email: cep@unifap.br

PROTOCOLO EXPERIMENTAL: TOXICIDADE AGUDA

Grupo/Animal: _____ Droga/ Via/ Dose: _____

Início: _____ / _____ / _____ Término: _____ / _____ / _____ Responsável: _____

SNC	30'	60'	120'	180'	240'	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°
a) Estimulante																		
*Hiperatividade																		
*Irritabilidade																		
*Agressividade																		
*Tremores																		
*Convulsões																		
*Piloereção																		
*Mov. das vibrissas																		
*Taquicardia																		
b) Depressora																		
*Ptose																		
*Sedação																		
*Ataxia																		
*Reflexo do endireitamento																		
*Catatonia																		
*Analgesia																		
*Resposta ao toque diminuída																		
*Perda do reflexo corneal																		
*Perda do reflexo auricular																		
c) Outros comportamento																		

[illegible][illegible]

QUANTIFICAÇÃO DOS EFEITOS: Sem Efeito (0) Efeito Mínimo (-) Efeito Presente (+) Efeito Intenso (++)

APÊNDICE II



Universidade Federal do Amapá
Laboratório de Pesquisa em Fármacos

PROTOCOLO EXPERIMENTAL: TOXICIDADE SUBAGUDA

Grupo: _____ Droga: _____
 Início: ____/____/____ Término: ____/____/____ Animais: _____
 Dose/ Via Administração: _____

Desenvolvimento Ponderal

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
R1										
R2										
R3										
R4										
R5										
	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20
R1										
R2										
R3										
R4										
R5										
	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
R1										
R2										
R3										
R4										
R5										

Controle de Água/Ração

DIA	Água (500mL)	Ração Reposição	Ração Consumida	Consumo Diário	DIA	Água (500mL)	Ração Reposição	Ração Consumida	Consumo Diário
D1					D16				
D2					D17				
D3					D18				
D4					D19				
D5					D20				
D6					D21				
D7					D22				
D8					D23				
D9					D24				
D10					D25				
D11					D26				
D12					D27				
D13					D28				
D14					D29				
D15					D30				

Pesquisador Responsável

APÊNDICE III



Universidade Federal do Amapá
Laboratório de Pesquisa em Fármacos

PROTOCOLO EXPERIMENTAL: ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE

Grupo: _____ Droga/ Via/ Dose: _____

Início: / / Término: / / Animais:

Indução (Droga/ Dose/ Via):

[illegible]

Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)	Glicemia		Glicosúria	
							Fita	Abs.	Fita	Abs.
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	VOLUME de Urina (mL)	Peso (g)				

Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)	Glicemia		Glicosúria	
							Fita	Abs.	Fita	Abs.
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)	Glicemia		Glicosúria	
							Fita	Abs.	Fita	Abs.
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				

Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)	Glicemia		Glicosúria	
							Fita	Abs.	Fita	Abs.
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				



Universidade Federal do Amapá
Laboratório de Pesquisa em Fármacos

Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)	Glicemia		Glicocúria	
							Fita	Abs.	Fita	Abs.
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)				
Data:	Animal	Água (250mL)	Ração (g) Reposição	Ração (g) Consumo	Volume de Urina (mL)	Peso (g)	Glicemia		Glicocúria	
							Fita	Abs.	Fita	Abs.

Pesquisador Responsável