

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO

**PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Cecropia pachystachya* E SEU POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO**

Juiz de Fora  
2009

**DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO**

**PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Cecropia pachystachya* E SEU POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Elita Scio Fontes

Juiz de Fora  
2009

**DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO**

**“PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DE *Cecropia pachystachya* E SEU POTENCIAL HIPOGLICEMIANTE EM RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ALOXANO”**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Aprovada em

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr. Elita Scio Fontes  
(Orientadora - Departamento de Bioquímica – UFJF)

---

Prof. Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes  
(Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG)

---

Prof Dr. Raúl Gonzalez Garcia  
(Departamento de Biologia Celular – UFJF)

*Dedico este trabalho aos meus  
queridos pais e à minha irmã*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por me dar sabedoria para tornar realidade mais um sonho*

*Aos meus pais pela presença mais que marcante durante todo esse trabalho, por acreditarem no meu sonho e por me incentivarem a vencer cada etapa. A conquista desse sonho é nossa. Amo muito vocês*

*A minha irmã Débora pela compreensão e incentivo*

*Aos meus anjinhos Vanda, José e Dário pelo apoio “à longa distância”*

*Aos meus tios, primos e vó Cida pela torcida*

*Ao Arthur por compreender a importância desse momento e trazer mais felicidade a essa etapa da minha vida*

*Aos meus amigos por entenderem minha ausência e torcerem sempre pelo meu sucesso*

*A minha orientadora Prof. Dra. Elita Scio Fontes, por me dar essa oportunidade e oferecer todo o apoio científico*

*A Lyvia pela presença amiga e auxílio em qualquer momento*

*A Juliana pelo auxílio nas atividades biológicas, aprendendo junto comigo a trabalhar com “ratinhos”*

*Ao Rodrigo por todo auxílio e paciência para me ensinar a trabalhar com HPLC*

*A todos os alunos, professores e técnicos do Departamento de Bioquímica pelo apoio técnico*

*Aos professores Rogério e Beatriz, do Departamento de Morfologia e Histologia, pelo auxílio nas análises histológicas*

*Ao professor Raúl pela colaboração desde a graduação*

*Ao Laboratório Eblen pela confecção das lâminas de histologia*

*Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF pelo fornecimento de animais, ração e maravalha*

*A coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas*

*A todos vocês que de alguma forma participaram desse sonho e me ajudaram a torná-lo realidade. Muito obrigada!!!*

*“Só é útil o conhecimento  
que nos torna melhor”  
Sócrates*

## RESUMO

Diabetes mellitus é uma síndrome que afeta mais de 180 milhões de pessoas no mundo e é provável que esse número chegue a mais que o dobro desse valor em 2030. A principal característica clínica do diabetes é a hiperglicemia. Vários trabalhos mostram que a hiperglicemia é crítica para o desenvolvimento de complicações nos diabéticos e que estes efeitos são associados ao estresse oxidativo. Neste contexto, o presente estudo investigou o efeito hipoglicemiante do extrato metanólico das folhas de *C. pachystachya* (400 mg/ml) em ratos normais e diabéticos induzidos com aloxano durante um período de 42 dias. O extrato apresentou uma acentuada redução dos níveis de glicemia de ratos diabéticos após 12 horas de sua administração. Este efeito não foi observado para ratos normais. Parâmetros bioquímicos foram determinados após 42 dias do tratamento e não foram observadas alterações significativas. Também foi realizado o estudo histológico do fígado e rim e não houve alterações nestes órgãos. Esse extrato apresentou igualmente relevante atividade antioxidante (DPPH e redução do poder). A triagem fitoquímica preliminar revelou a presença de fenóis, flavonóides, cumarinas, taninos, esteróides, antraquinonas e alcalóides. Ácido clorogênico também foi identificado no extrato. As conclusões revelam que *C. pachystachya* possui uma potente atividade antioxidante e hipoglicemiantes. Não foram observados efeitos adversos durante o período estudado indicando que a espécie vegetal é promissora para o tratamento da diabetes.

Palavras-chave: *Cecropia pachystachya*. Diabetes. Hipoglicemiante. Antioxidante.

## ABSTRACT

*Diabetes mellitus* is a syndrome that affects more than 180 million of people around the world and the number is likely to more than double by 2030. The prime clinical characteristic of diabetes is the hyperglycemia. Several works show that hyperglycemia is critical on diabetic complication development and that these effects are associated to oxidative stress. In this regard, this study investigate the hypoglycemic effect of the methanolic extract of leaves of *C. pachystachya* (400 mg/ml) in normal, glucose loading and alloxan-induced diabetic rats during a period of 42 days. The extract presented a pronounced decrease on the blood glucose levels of diabetic rats in 12 hours after extract administration. This effect was not observed for normal rats. Biochemical parameters were determined after 42 days treatment and no significant changes were observed. The histological study of the liver and kidney was also performed and no alterations were observed in these organs. This extract also presented relevant antioxidant activity (DPPH and reduction power). A preliminary phytochemical screening revealed the presence of phenols, flavonoids, coumarins, tannins, steroids, anthraquinones and alkaloids. Chlorogenic acid was also identified in the extract. The findings show that *C. pachystachya* possesses a powerful hypoglycemic and antioxidant activity. No adverse effects were observed during the studied period indicating that is promising plant species for handling of diabetes.

Keywords: *Cecropia pachystachya*. Diabetes. Hypoglycemic. Antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Desenho 1 Estrutura da insulina.....	23
Desenho 2 Vias de sinalização da insulina.....	26
Desenho 3 Fórmula estrutural da glibenclamida.....	28
Desenho 4 Fórmula estrutural da metformina.....	30
Desenho 5 Fórmula estrutural da acarbose.....	33
Desenho 6 Fórmula estrutural da repaglinida.....	34
Desenho 7 Fórmula estrutural da nateglinida.....	35
Desenho 8 Fórmula estrutural da troglitazona.....	36
Desenho 9 Núcleo fundamental dos flavonóides.....	51
Desenho 10 Estrutura química dos ácidos benzóicos.....	53
Desenho 11 Estrutura química dos ácidos cinâmicos.....	53
Desenho 12 Estrutura química do ácido clorogênico e do flavonóide isoorientina.....	58
Fotografia 1 <i>Cecropia pachystachya</i> .....	60
Fotografia 2 Frutos de <i>C. pachystachya</i> .....	61
Gráfico 1 Perfil cromatográfico por CLAE do ácido clorogênico.....	84
Gráfico 2 Perfil cromatográfico por CLAE do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> .....	85
Gráfico 3 Efeito hipoglicemiante agudo do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos Curva glicêmica.....	88
Gráfico 4 Efeito hipoglicemiante agudo do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	89
Gráfico 5 Efeito hipoglicemiante sub-crônico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos.....	90
Gráfico 6 Efeito hipoglicemiante crônico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos.....	91
Gráfico 7 Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos diabéticos e não diabéticos. Peso corporal.....	92

Gráfico 8	Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos diabéticos e não diabéticos. Consumo de ração.....	93
Gráfico 9	Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos diabéticos e não diabéticos. Consumo de água.....	94
Gráfico 10	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Provas de funções hepática e biliar, níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	95
Gráfico 11	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Provas de funções hepática e biliar, níveis séricos de bilirrubina total, bilirrubina direta e bilirrubina indireta.....	96
Gráfico 12	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Provas de funções hepática e biliar, níveis séricos de fosfatase alcalina.....	97
Gráfico 13	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Perfil protéico, níveis séricos de proteínas totais, albumina e globulina.....	98
Gráfico 14	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Provas de função renal, níveis plasmáticos de ureia e creatinina.....	99
Gráfico 15	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Prova de função pancreática, níveis séricos de amilase.....	100
Gráfico 16	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Perfil lipídico, níveis séricos de triglicérides.....	101
Gráfico 17	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Perfil lipídico, níveis séricos de colesterol total e frações (colesterol LDL, colesterol VLDL, e colesterol HDL.....	102
Gráfico 18	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Hemograma completo, eritrograma.....	103,104
Gráfico 19	Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> . Hemograma completo, leucograma.....	105

Fotografia 3 Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> , análise histológica do cortex renal.....	106
Fotografia 4 Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> , análise histológica da medula renal.....	107
Fotografia 5 Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> , análise histológica do fígado.....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aC - antes de Cristo

acetil-CoA – Acetil Coenzima A

ADA - “American Diabetes Association”, Associação Americana de Diabetes.

AGE - Produtos finais da glicosilação avançada

AlCl<sub>3</sub> – Cloreto de alumínio

ALT – Alanina aminotransferase

AMPK - Proteína quinase ativada por AMP

Anvisa - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato aminotransferase

ATP - Adenosina Trifosfato.

Ca<sup>2+</sup> - Ion cálcio

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DAG – Diacilglicerol

dC - depois de Cristo

DCN – Diabético controle negativo

DE – Diabético extrato

DG – Diabético glibenclamida

DM – Diabético Metformina

DMSO – Dimetilsufóxido

DPPH - 2,2'-difenil-1-picrihidrazilo

EAT - equivalente de ácido tânico

ERRO's – Espécies reativas de oxigênio

FeCl<sub>3</sub> – Cloreto férrico

G-6P - Glicose-6-fosfato-fosfatase

GLUT - Transportador de glicose

GSH – Glutathiona

GTP - Glutamato-piruvato transaminase

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Ácido fosfórico

HCl – Ácido clorídrico

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IDDM - Diabetes melito insulino-dependente  
IM – Intramuscular  
IV – Intravenosa  
K<sup>+</sup> - Ion potasio  
K<sub>M</sub> – Constante de afinidade  
KOH – Hidróxido de potássio  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
Luz UV – Luz ultravioleta  
Min – Minutos  
NaCl – Cloreto de sódio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
NCN – Normal controle negativo  
NE – Normal extrato  
NIDDM – Diabetes melito não insulino-dependente  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PKC – Proteína quinase C  
PPAR-γ - receptores ativadores de peroxissomo proliferativo  
SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes  
SC – subcutânea  
SH – Gupos tiol  
STZ – Estreptozotocina  
SUR – Receptores de sulfoniluréias  
TG – Triglicérides  
TGO - Glutamato-oxaloacetato transaminase  
TOTG - Teste oral de tolerância à glicose  
UKPDS - The United Kingdom Prospective Diabetes Study  
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade  
V<sub>max</sub> – Velocidade máxima

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 DIABETES MELITO.....	16
1.1.1 Histórico.....	17
1.1.2 Epidemiologia.....	18
1.1.3 Diagnóstico e aspectos fisiológicos.....	20
1.1.4 Tratamento .....	22
1.1.5 Diabetes melito e estresse oxidativo.....	37
1.1.6 Complicações do diabetes melito.....	40
1.1.7 Modelos de indução de diabets melito.....	42
1.2 O USO DE PLANTAS HIPOGLICEMIANTES.....	46
1.2.1 Produtos naturais hipoglicemiantes e principais mecanismos de ação.....	48
1.2.2 O uso popular de plantas do gênero <i>Cecropia</i> .....	54
1.2.3 Aspectos biológicos e farmacológicos de plantas do gênero <i>Cecropia</i> .....	56
1.2.4 Constituintes bioativos isolados de <i>Cecropia</i> .....	57
1.2.5 <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul.....	59
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	61
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	62
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	63
4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	64
4.1.1 Análise fitoquímica.....	64

4.1.2	Determinação do conteúdo de fenóis totais.....	68
4.1.3	Determinação do conteúdo de flavonóides.....	69
4.1.4	Determinação do perfil cromatográfico por CLAE.....	69
4.2	ESTUDO BIOLÓGICO.....	70
4.2.1	Atividade citotóxica contra <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Test”).....	70
4.2.2	Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres – método do DPPH.....	71
4.2.3	Determinação do poder de redução.....	72
4.3	ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	73
4.3.1	Atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos.....	73
4.3.2	Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> e avaliação do seu potencial toxicológico em ratos normais e diabéticos.....	78
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	81
5	<b>RESULTADOS</b> .....	82
5.1	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	82
5.1.1	Análise fitoquímica.....	82
5.1.2	Determinação do conteúdo de fenóis totais.....	83
5.1.3	Determinação do conteúdo de flavonóides.....	84
5.1.4	Determinação do perfil cromatográfico por CLAE.....	84
5.2	ESTUDO BIOLÓGICO.....	85
5.2.1	Atividade citotóxica contra <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Test”).....	85
5.2.2	Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres – método do DPPH.....	86
5.2.3	Determinação do poder de redução.....	86
5.3	ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	87

5.3.1 Atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos.....	87
5.3.2 Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> e avaliação do seu potencial toxicológico em ratos normais e diabéticos.....	92
5.4 RESUMO DOS RESULTADOS.....	109
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>112</b>
6.1 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	112
6.2 ESTUDO BIOLÓGICO.....	113
6.2.1 Atividade citotóxica contra <i>Artemia salina</i> (“Brine Shrimp Test”)....	113
6.2.2 Atividade antioxidante.....	114
6.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	116
6.3.1 Atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de <i>C. pachystachya</i> em ratos normais e diabéticos.....	116
6.3.2 Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> e avaliação do seu potencial toxicológico em ratos normais e diabéticos.....	122
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>135</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>159</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELITO

Diabetes melito é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento da glicemia, alterações no metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, resultantes de secreção deficiente ou de resistência periférica à insulina. Estas alterações aumentam a tendência ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e neuropatias, as quais representam uma das maiores causas de morte de pacientes (SMITH, T. W. 1992; PAULSON, 1996, BALKAU *et al*, 2004; SUAREZ *et al*, 2005).

No diabetes melito, ao lado de um menor transporte de glicose nos tecidos sensíveis à insulina, há também uma grande produção de glicose pelo fígado. Estas anormalidades são decorrentes, principalmente, de insuficiente secreção de insulina em resposta à glicose e/ou da insensibilidade tecidual à ação da insulina (resistência à insulina). As causas do aparecimento de diabetes não são completamente conhecidas. Ao menos, uma predisposição é hereditária. Foram reconhecidos dez diferentes tipos de genes relacionados ao diabetes tipo 1, sendo que os mais importantes estão situados nos cromossomos 6 e 11, onde estão os genes responsáveis pela produção de insulina (TODD, 1995). O diabetes pode ainda ser causado por destruição de células  $\beta$  por drogas ou por doenças de origem viral, ou desenvolver-se em decorrências de desnutrição ou gravidez.

### 1.1.1 Histórico

O conhecimento sobre diabetes melito é anterior à Era Cristã. Para Arduíno (1980) o papiro de Ebers (1500 aC) descreve uma enfermidade associada a uma diurese excessiva. Celsus (30 aC – 50 dC) reconheceu o quadro porém, somente dois séculos mais tarde, outro médico grego, Aereteo de Capadócia, cunhou o nome de diabetes, significando sifão. Nos séculos III e VI dC há descrições na China, Japão e Índia a respeito de uma condição associada à poliúria, com urina doce e adesiva. Entretanto, mesmo que durante séculos houvesse a suposição de que a urina do diabético fosse açucarada, coube a Willis, em 1674, a observação “... como imbuída de mel e açúcar”, estabelecendo-se assim a denominação *diabetes mellitus* (mellitus = mel). Um século mais tarde, Robson demonstrou que a doçura da urina se devia à presença de açúcar (ALBERTE, 2004).

Desde as primeiras descobertas a respeito do diabetes, os avanços em sua compreensão foram lentos até os meados do século XIX. Em 1921, Benting e Best conseguiram obter a insulina pancreática; em 1923, pelo prosseguimento de suas pesquisas, a insulina simples ou regular passou a ser disponível para o tratamento. Na década de trinta, surge a insulina de ação prolongada, a NPH (Neutral Protamine Hagedorn) a qual passou a ser utilizada pelos pacientes de diabetes tipo 1 até os dias de hoje (ALBERTE, 2004).

Já os antidiabéticos foram descobertos como efeito colateral de drogas utilizadas com outros propósitos. Em 1942, Jambon et al. verificaram acidentes hipoglicêmicos fatais durante o uso do zol-IPDT no tratamento da febre tifóide. Em 1955, Loubatières (França), Frank e Fuchs (Alemanha) descobriram a carbutamida (sulfanilbuticarbamida), a primeira sulfonilureia comercializada, mas hoje retirada do mercado devido à sua elevada toxicidade. Em 1956, Bander et al. (Alemanha) descobriram a tolbutamida. Um ano depois, foram introduzidos na terapêutica antidiabética a clorpropamida, o fenformin, bem como a glibenclamida e posteriormente outras drogas (ARDUÍNO, 1980).

### 1.1.2 Epidemiologia

Diabetes melito é um problema de importância crescente em saúde pública, pois sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas. Este aumento se deve, principalmente, ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização e crescente prevalência de obesidade e sedentarismo (WILD *et al.*, 2004).

Em 1985, estimava-se que existiam 30 milhões de adultos com diabetes no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 344 milhões no ano de 2030 (WILD *et al.*, 2004).

Atualmente, a prevalência do diabetes é maior em países desenvolvidos e estima-se que continuará sendo. Porém, o aumento proporcional será maior em países em desenvolvimento, que em 2030 concentrará 2/3 dos indivíduos diabéticos. A estimativa é de 70% de aumento na prevalência em países em desenvolvimento, contra 42% nos países desenvolvidos (KING, AUBERT e HERMAN, 1998; WILD *et al.*, 2004).

No ranking dos dez países com maior número de casos de diabetes, a Índia aparece em primeiro lugar, seguida da China e dos Estados Unidos nas estimativas dos anos de 1995, 2000 e para 2030. O Brasil aparece em oitavo lugar nas listas de 1995 e 2000, saltando para o sexto lugar na estimativa para 2030, com aproximadamente 11,3 milhões de doentes (KING *et al.*, 1998; WILD *et al.*, 2004). Em 2005, a população de diabéticos no Brasil era de 8 milhões, ou seja, 4,5% da população (SBD, 2009). Nos Estados Unidos, aproximadamente 20 milhões de pessoas são diabéticas, o que corresponde a cerca de 7% da população total. Estima-se que outros 54 milhões apresentem pré-diabetes, muitos não-diagnosticados (ADA, 2008).

No mundo, o número de mortes atribuídas ao diabetes, atualmente, está em torno de 800 mil. Entretanto, sabe-se que este número de óbitos é consideravelmente subestimado. Frequentemente, a doença não é mencionada na declaração de óbito pelo fato de serem suas complicações, particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares, as causas de morte. Em uma estimativa mais realista, a SBD (2009) sugere cerca de 4 milhões de óbitos anuais relacionados à presença dessa doença, com importante contribuição de complicações cardiovasculares.

Sua natureza crônica, a gravidade de suas complicações e os meios necessários para controlá-las tornam o diabetes uma doença muito onerosa, não apenas para os indivíduos afetados e suas famílias, mas também para o sistema de saúde (SBD, 2009). Nos Estados Unidos, os gastos com indivíduos diabéticos são 2 a 30 vezes maiores que os gastos com indivíduos que não apresentam a doença, e o custo econômico total do diabetes foi estimado em 174 bilhões de dólares em 2007, sendo 27 bilhões em custos diretos (ADA, 2008). No Brasil, o custo direto está em torno de 3,9 milhões de dólares, em comparação com 0,8 bilhão para a Argentina e 2 bilhões para o México (BARCELÓ *et al.*, 2003). Além do problema econômico, os custos intangíveis (dor, ansiedade e perda de qualidade de vida, por exemplo) também apresentam grande impacto na vida das pessoas com diabetes e suas famílias e são difíceis de serem quantificadas (SBD, 2009).

### 1.1.3 Diagnóstico e aspectos fisiológicos

Segundo a American Diabetes Association (2008), três critérios podem ser empregados para o diagnóstico da doença: glicemia de jejum superior a 126mg/dl; glicemia superior a 200mg/dl no teste de tolerância oral à glicose (TTOG), que consiste na avaliação da glicemia 2 horas após ingestão de 75g de glicose; ou ainda glicemia casual (a qualquer hora do dia) superior a 200mg/dl associada a sintomas do diabetes melito. O método mais utilizado é a dosagem da glicemia de jejum, por ser mais rápido, mais aceito pelos pacientes e ter menor custo. Caso o paciente apresente glicemia de jejum entre 100 e 125mg/dl ou entre 140 e 199mg/dl após o TTOG, é classificado como portador de tolerância à glicose diminuída (ADA, 2008).

A classificação e a nomenclatura do diabetes e de outros tipos de intolerância à glicose foram estabelecidas pelo National Diabetes Data Group (1979) e, subsequentemente, se tornaram a base para classificação de diabetes melito da Organização Mundial de Saúde (OMS). A classificação atualmente recomendada baseia-se na etiologia do diabetes, eliminando os termos “diabetes melito insulino-dependente (IDDM)” e “não insulino-dependente (NIDDM)” Nessa nova classificação, diabetes melito pode ser dividido em tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos (RAMALHO, 2002).

O diabetes tipo 1 é um distúrbio catabólico em que a insulina está ausente; o glucagon elevado e as células  $\beta$  pancreáticas falham em responder a estímulos insulinogênicos. A insulina exógena é necessária para reverter o estado catabólico, prevenir cetose, reduzir a hiperglucagonemia e a glicose sanguínea. Diabetes tipo 1 resulta primariamente da destruição das células  $\beta$  pancreáticas com tendência à cetoacidose (RAMALHO, 2002). Inclui casos de doença auto-imune (tipo 1a) e aqueles nos quais a causa da destruição das células  $\beta$  é idiopática (tipo 1b). É diagnosticada principalmente em crianças e jovens, mas pode ocorrer também em adultos. A taxa de destruição de células  $\beta$  é variável, sendo em geral mais rápida entre as crianças. Esse tipo de diabetes corresponde a 5 a 10% dos casos (OLIVEIRA, 2008). Os principais sintomas do diabetes tipo 1 são: aumento de

micção (frequência e volume), aumento da sede, perda de peso e cansaço. Estes sintomas são causados pelo aumento de glicose no sangue e de sua perda na urina. A perda de glicose e de água na urina resulta em desidratação, o que provoca efeitos osmóticos e sede (COSTA, 2005).

O diabetes tipo 2 representa um grupo heterogêneo que abrange várias formas do diabetes que ocorrem de modo predominante no adulto, mas ocasionalmente em adolescentes. A insulina endógena circulante é suficiente para prevenir cetoacidose (na maioria das vezes, excetuando alguns casos de infecção), mas insuficiente ou relativamente inadequada, devido à insensibilidade dos tecidos. A maior parte dos pacientes com diabetes tipo 2 é obesa, e a obesidade leva a uma aumento da resistência à insulina. Além da insensibilidade à insulina nos tecidos periféricos, na maioria dos pacientes com diabetes tipo 2 existe uma diminuição da secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas frente a um estímulo de aumento da glicemia (UNGER e FOSTER, 1998). Muitos casos são diagnosticados apenas após as complicações aparecerem e estima-se que 1/3 dos casos não chegam a ser diagnosticados. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, no entanto podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado. Corresponde de 90 a 95% dos casos de diabetes (OLIVEIRA, 2008).

O diabetes gestacional representa qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Acomete de 1 a 14% das mulheres grávidas (OLIVEIRA, 2008).

Outros tipos específicos incluem defeitos genéticos funcionais das células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidas por fármacos e agentes químicos, infecções, outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes (RAMALHO, 2002).

A resistência à insulina ou a sua ausência no organismo diminuem a eficiência de utilização periférica da glicose e aumentam sua produção, elevando a glicemia. Ocorre ainda depleção das proteínas do organismo e aumento da utilização de lipídeos para obtenção de energia e síntese de colesterol (GUYTON e

HALL, 1998). A concentração elevada de colesterol e ácidos graxos livres no plasma, em conjunto com as alterações estruturais que ocorrem nos tecidos corporais em decorrência da hiperglicemia, conduzem ao desenvolvimento de lesões micro e macrovasculares, responsáveis pelo aparecimento de complicações crônicas que frequentemente estão associadas ao diabetes, como retinopatia, nefropatia e neuropatia e macroangiopatia, tendo como manifestações o infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (GUYTON e HALL, 1998; ADA, 2005). As complicações do diabetes comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes.

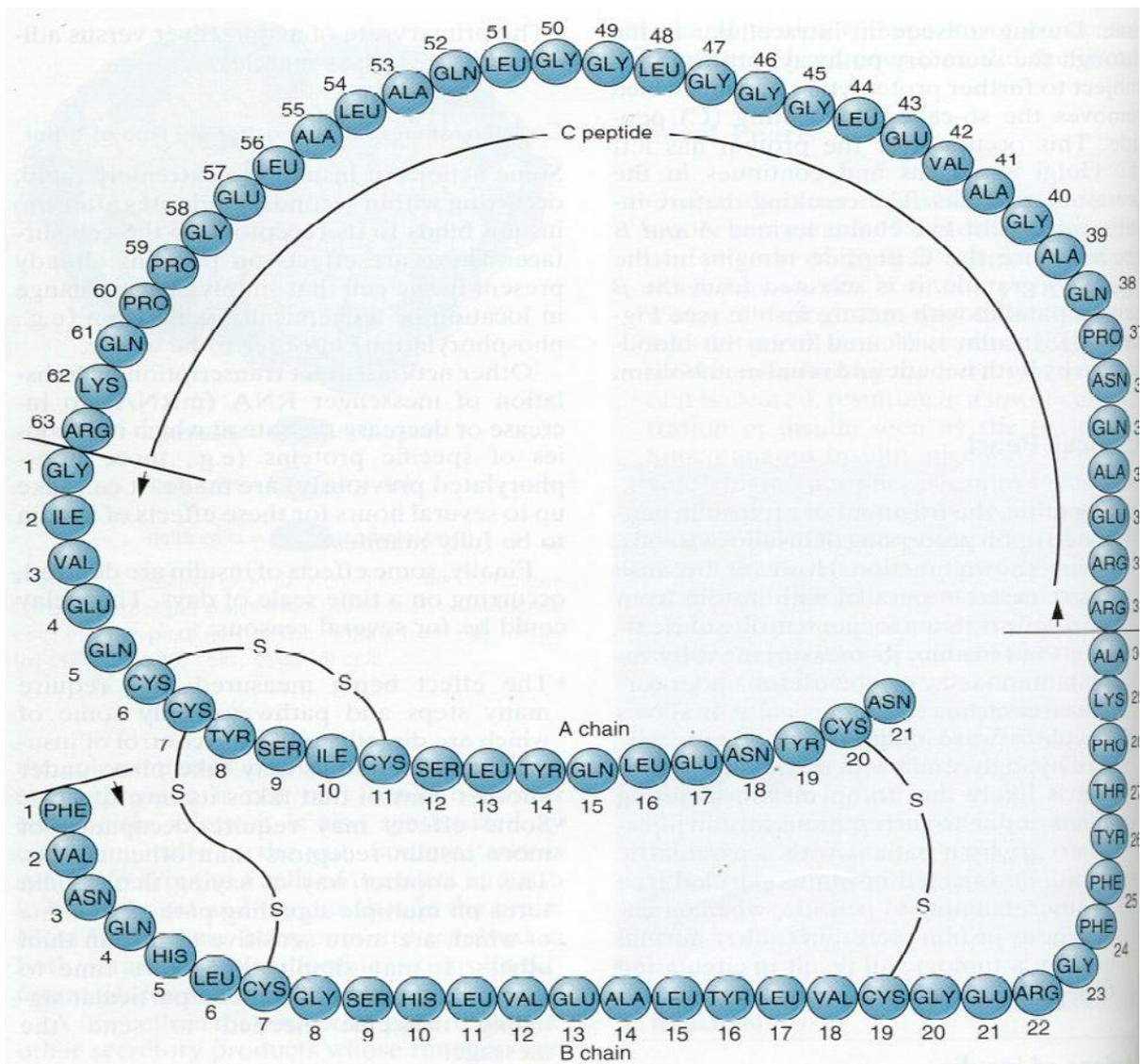
#### **1.1.4 Tratamento**

O tratamento compreende dois conjuntos de medidas, as não medicamentosas e as medicamentosas. O primeiro conjunto é representado por um plano alimentar, um plano de atividade física e um plano de educação com informações sobre saúde e diabetes. Todos devem ser individualizados. Quando após estas medidas o controle adequado do diabetes não foi obtido, estão indicadas as medidas medicamentosas com os comprimidos orais e a insulina (SBD, 2009).

O tratamento medicamentoso de diabetes melito envolve um conjunto de medidas que tentam, passo a passo e simultaneamente, aumentar o consumo e diminuir a oferta de glicose, sensibilizar tecidos periféricos à ação da insulina ou estimular sua liberação pelas células  $\beta$  e, nos casos de diabetes tipo 1, a reposição de insulina (RAMALHO, 2002).

## Insulina

A insulina é um hormônio constituído de duas cadeias peptídicas, A e B, unidas por duas pontes dissulfeto (Desenho 1). A cadeia A é composta de 21 aminoácidos e contém uma ponte dissulfeto; a B, de 30 aminoácidos. A porção terminal carboxílica da cadeia B e as extremidades amínica e carboxílica da cadeia A formam a porção da molécula que interage com o receptor. As cadeias da insulina isoladamente são inativas (RAMALHO, 2002).



**Desenho 1:** Estrutura da insulina. O desenho mostra as suas cadeias A e B, unidas por duas pontes dissulfeto, e a estrutura do peptídeo C. Fonte: Ramalho, 2002.

A insulina é produzida nas células  $\beta$  do pâncreas como precursor inativo (pré-pró-insulina) no retículo endoplasmático rugoso e é clivada a pró-insulina (86 aminoácidos), que é transferida para vesículas no complexo de Golgi, onde é estocada, juntamente com as enzimas responsáveis por sua conversão em insulina (endopeptidases). A pró-insulina é convertida à insulina pela clivagem do polipeptídeo conectante (peptídeo C, Desenho 1) (RAMALHO, 2002).

A insulina atua no fígado, músculo e tecido adiposo. No fígado, ela estimula a síntese e o armazenamento de glicogênio, triglicérides e colesterol. Além disso, ela inibe a cetogênese, glicogenólise e gliconeogênese. Nos músculos, ela promove a síntese e o armazenamento de proteínas e glicogênio, e inibe o catabolismo de proteínas. E no tecido adiposo, estimula a lipogênese e ativa o sistema de transporte de glicose para dentro das células adiposas e musculares, além de inibir a lipólise e promover o armazenamento de triglicérides (SALTIEL e PESSIN, 2003).

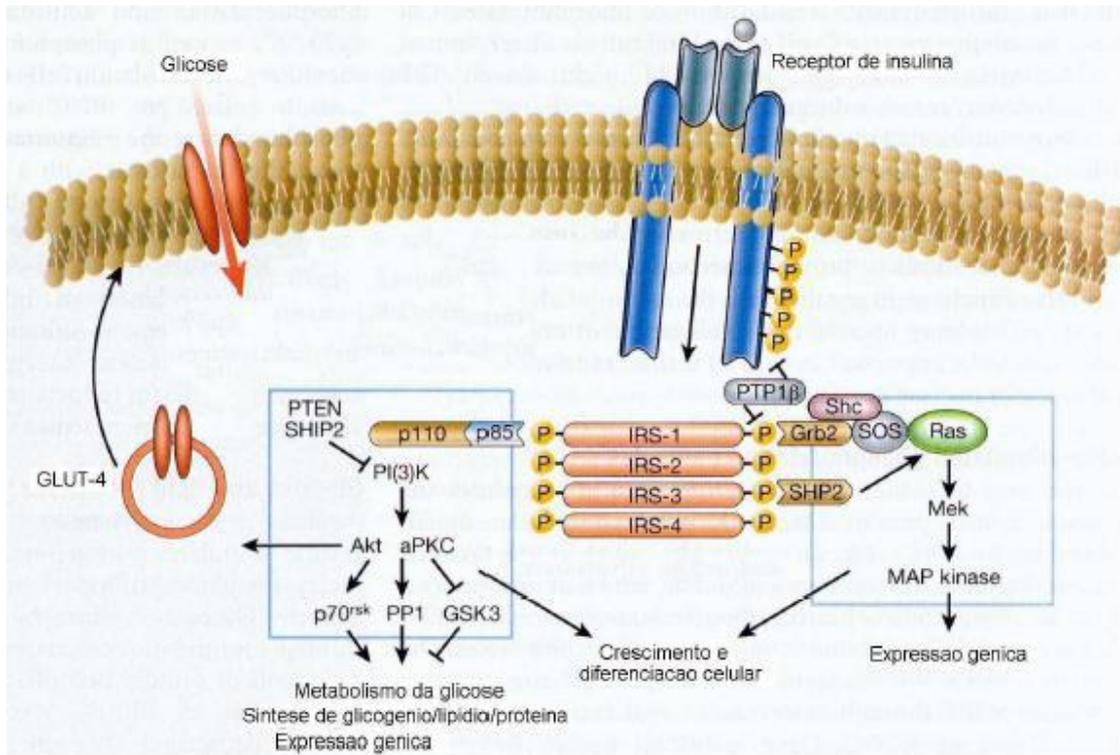
O processo de secreção de insulina estimulado por glicose inicia-se pela difusão facilitada dessa hexose, via GLUT1 ou GLUT 2, através da célula beta pancreática. Segue-se então a fosforilação catalisada pela hexoquinase e a metabolização na via glicolítica e no ciclo de Krebs. O aumento da razão citosólica ATP/ADP, atuando via subunidade receptora de sulfonilureias (SUR1) gera o fechamento de canais de  $K^+_{ATP}$ , resultando na redução do efluxo de  $K^+$ . O acúmulo desse íon no citosol provoca despolarização da membrana plasmática e abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. O aumento da entrada de  $Ca^{2+}$  eleva a atividade citosólica desse cátion e desencadeia a exocitose dos grânulos de insulina (ASHCROFT e ASHCROFT, 1992; LENZEN, 1992; MALAISSE, 1992; AIZAWA *et al.*, 1994; AMMON e WAHL, 1994; BERGGREN *et al.*, 1994; RORSMAN *et al.*, 1994; INAGAKI *et al.*, 1995; BOSCHERO, 1996; AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1998; BOSCHERO *et al.*, 1998).

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática. Esse receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas concentrações variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200 000 nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por 2

subunidades  $2\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , unidas por ligações dissulfeto (KAHN, 1985). A subunidade  $\alpha$  é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade  $\beta$  é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase (KASUGA *et al.*, 1982). O ATP age como doador de fosfatos e a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina. O mecanismo molecular exato da ação da insulina não está totalmente esclarecido, mas parece depender da remoção do efeito inibitório da subunidade  $\alpha$  sobre a atividade da subunidade  $\beta$  do seu receptor (RIBEIRO, 2008).

A insulina induz a autofosforilação do receptor, aumentando a sua capacidade de fosforilar um ou mais substratos protéicos intracelulares. A fosforilação de seus substratos dá início a uma série de eventos incluindo a cascata de reações de fosforilação e desfosforilação que regula os seus efeitos metabólicos e de crescimento (SUN *et al.*, 1991; WHITE, 1997).

A Desenho 2 mostra um esquema simplificado das etapas de sinalização intracelular desde a ligação da insulina a seu receptor até a ativação do transporte de glicose. Os eventos que ocorrem após a ligação da insulina a seu receptor são altamente regulados e específicos (PESSIN e SALTIEL, 2000).



**Desenho 2:** Vias de sinalização da insulina. Fonte: Zecchin *et al.*, 2004.

A glicose é transportada para o interior da célula  $\beta$  pancreática por uma proteína integral de membrana, denominada GLUT2. Essa proteína possui um elevado  $K_M$  (entre 15 e 20 mmol/l), portanto não é saturável em concentrações fisiológicas de glicose) e um  $V_{max}$  muito elevado, permitindo que o transporte de glicose aumente rapidamente quando a glicemia se eleva. Após entrar na célula  $\beta$ , a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6P) por duas enzimas: a hexoquinase IV (glucoquinase) de baixa afinidade ( $K_M$  entre 6 a 11mmol/L) e a hexoquinase I de alta afinidade ( $K_M < 0,1\text{mmol/L}$ ). Entretanto, a enzima de alta afinidade é fortemente inibida pela glicose-6-fosfato e, em menor grau, pela frutose-1-6-difosfato, o que transfere para a glucoquinase o papel preponderante na fosforilação da glicose nas células  $\beta$ . Esse mecanismo funciona como válvula de segurança, permitindo a formação de glicose-6-fosfato, em concentrações fisiológicas e suprafisiológicas de glicose no sangue (MATSCHINSKY, 1996; BOSCHERO, 1996). Confere ainda à glucoquinase papel fundamental na regulação do fluxo glicolítico e, portanto, na secreção de insulina, o que caracteriza essa enzima como o sensor da glicose nas

células secretoras de insulina. O destino preferencial da G-6P na célula  $\beta$  é a glicólise (BOSCHERO, 1996).

A regulação da secreção de insulina está relacionada com uma série de fatores, entre eles, nutrientes, hormônios gastrointestinais e pancreáticos, neurotransmissores autonômicos e glicose. A glicose é o principal estímulo da secreção de insulina, e o açúcar por via oral é mais eficaz para provocar secreção de insulina que por via parenteral (RAMALHO, 2002).

A insulina é indicada no tratamento de pacientes com diabetes tipo 1, tipo 2 sem controle adequado com dieta e/ou antidiabético oral, diabetes gestacional, tratamento de cetoacidose diabética, coma hiperosmolar não-cetótico e controle pré-operatório de pacientes com diabetes tipos 1 e 2. Todos os pacientes com diabetes tipo 1 requerem injeções diárias de insulina para evitar a cascata metabólica que leva à cetoacidose, coma e morte. O objetivo da terapêutica é manter a glicemia pré e pós-prandial com normalização dos níveis de hemoglobina glicosilada (RAMALHO, 2002).

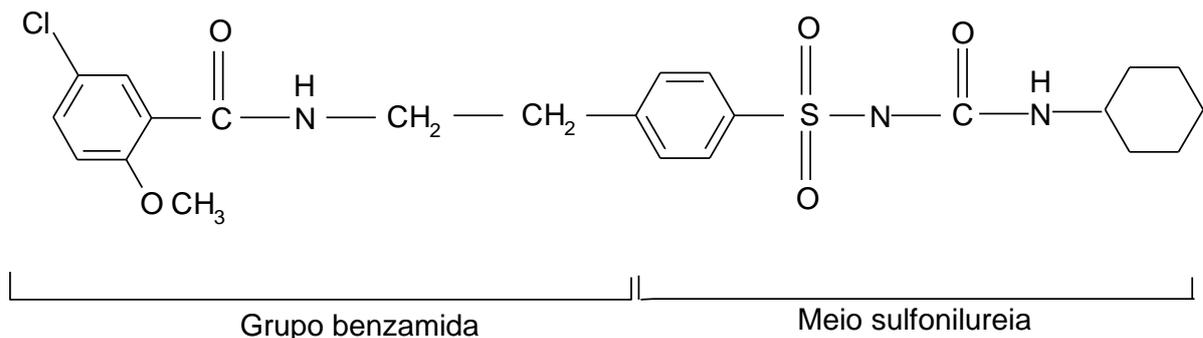
As insulinas diferem em início e duração de ação (ultra-rápida, rápida, intermediária e lenta), espécie de origem (humana, suína, bovina ou mistura bovina/suína) e pureza. A mais usada atualmente é a de 100U (100 U/ml) (RAMALHO, 2002). A insulina pode ser administrada IV, IM ou SC, e o tratamento prolongado é feito com administração SC.

## Hipoglicemiantes orais

### Sulfonilureias

As sulfonilureias têm sido utilizadas para o tratamento do diabetes há mais de 50 anos. Atualmente, as sulfonilureias continuam sendo a principal forma de tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 (FISMAN *et al*, 2004). A primeira sulfonilureia utilizada foi a tolbutamida, que foi substituída pela glibenclamida e a gliburida. Atualmente existe uma nova geração de sulfonilureia, a glimepiridina, que tem efeito mais específico no pâncreas (FISMAN *et al*, 2004).

As sulfonilureias possuem um radical sulfona ligado a um grupo ureia. Diferentes sulfonilureias possuem diferentes radicais  $R_1$  e  $R_2$  com potência hipoglicemiante oral variável (RAMALHO, 2002). A estrutura da glibenclamida é mostrada na Desenho 3.



**Desenho 3:** Fórmula estrutural da glibenclamida, um hipoglicemiante oral da classe das sulfonilureias. Fonte: Costa, 2005.

A absorção das sulfonilureias é razoavelmente rápida e completa. São ácidos fortes e circulam ligadas às proteínas plasmáticas (70 a 90 %, principalmente à albumina). São metabolizadas no fígado a compostos inativos (no caso da glibenclamida) ou ativos (no caso da tolbutamida), que são excretados na urina, principalmente por secreção tubular. Aproximadamente metade dos metabólitos inativos da glibenclamida é excretada na bile. As diferenças terapêuticas entre as sulfonilureias são a duração de ação, meia-vida de eliminação e potência (RAMALHO, 2002).

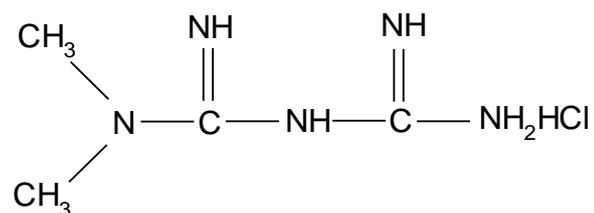
Apesar de as sulfonilureias serem derivados sulfonamídicos, não possuem atividade antibacteriana. Para sua ação, as células  $\beta$  pancreáticas devem estar presentes, sendo ineficazes em pacientes pancreatectomizados ou naqueles sem insulina endógena (RAMALHO, 2002). Seu uso é recomendado a pacientes diabéticos do tipo 2 que não respondem apenas à dieta e cujo pâncreas ainda conserva parcela de capacidade de produção e secreção de insulina (LARNER, 1983).

O modo de ação das sulfonilureias envolve a sua ligação aos receptores específicos (SUR1). Outros mecanismos propostos para as sulfonilureias são: inibição da liberação de glicose pelo fígado; potencialização da atividade insulínica presente; diminuição da insulinase; aumento na concentração de sítios receptores de insulina nas superfícies de células mononucleares e de adipócitos, o que pode explicar um aumento de sensibilidade à insulina. O aumento da sensibilidade dos receptores à ação da insulina pode decorrer do próprio controle da glicemia, pois a hiperglicemia crônica, por si, prejudica a secreção de insulina e leva à resistência em tecidos periféricos, efeito conhecido como glicotoxicidade. As sulfonilureias diminuem a glicemia tanto em indivíduos diabéticos quanto em não-diabéticos (RAMALHO, 2002).

A glibenclamida pode causar reações hipoglicêmicas, inclusive levando o paciente ao coma devido à redução dos níveis de glicose circulatória. Por outro lado, as sulfonilureias são contra-indicadas em pacientes com insuficiência hepática e/ou renal em virtude do seu papel na eliminação do medicamento. Sulfonilureias também podem causar intolerância ao álcool, provocando náuseas, rubor e palpitações (LARNER, 1983).

## Biguanidas

As biguanidas são derivadas da guanidina e foram introduzidas, na década de 50, para uso clínico no tratamento da hiperglicemia em pacientes com diabetes tipo 2. Três biguanidas (fenformina, metformina e buformina) eram disponíveis inicialmente. Fenformina e buformina foram retiradas do uso clínico devido à significativa incidência de acidose lática. A metformina, introduzida na França em 1959, continua a ser usada pelo mundo e foi reintroduzida nos Estados Unidos (RAMALHO, 2002). Sua fórmula estrutural é apresentada na Desenho 4.



**Desenho 4:** Fórmula estrutural da metformina, um hipoglicemiante oral da classe das biguanidas. Fonte: Costa, 2005

Metformina tem sido utilizada no tratamento de diabetes tipo 2, em monoterapia ou associada a outras drogas, pois melhora o controle glicêmico e lipídico em pacientes que não respondem à dieta alimentar (De FRONZO e GOODMAN, 1995; HOWLETT e BAILEY, 1999). Em contraste com as sulfonilureias, metformina promove a perda de peso do diabético, não aumenta a secreção de insulina e não causa hipoglicemia. Conseqüentemente, a metformina favorece a

diminuição da resistência à insulina. Recentemente, também foi demonstrado que ela protege contra doenças cardiovasculares, particularmente, em obesos, dislipidêmicos e hipertensos (HOWLETT e BAILEY, 1999). Em conjunto, vários efeitos da metformina reduzem a glicemia: supressão da saída de glicose hepática, estimulação da captação de glicose pelas células musculares, estimulação do aumento do armazenamento de glicogênio e inibição da oxidação de ácidos graxos (RICCIO *et al*, 1991; STUMVOLL *et al*, 1995; Da SILVA, 1998, BAILEY, 1999).

O mecanismo de ação da metformina é multifatorial, mas ainda não é completamente conhecido. Tem sido sugerido que metformina pode ativar o mecanismo de ação da insulina, aumentando a atividade do receptor de insulina levando a translocação dos transportadores de glicose GLUT 4 para a membrana plasmática dos músculos esqueléticos (HOWLETT e BAILEY, 1999). Contudo, a presença de insulina é necessária para que o efeito da metformina se manifeste, o que parece envolver o prolongamento do efeito da insulina na célula (BAILEY, 1995).

Nos músculos esqueléticos, tecido adiposo e fígado, a metformina aumenta a oxidação de glicose e diminui a oxidação de ácidos graxos livres. Entretanto, metformina talvez possa também afetar a oxidação de glicose e ácidos graxos livres em outros tecidos, inclusive nas células  $\beta$ . Estes efeitos são importantes para o tratamento de diabéticos pois, quando os ácidos graxos livres estão em excesso, a oxidação de glicose diminui (ciclo de Randle) principalmente pela inibição da atividade da piruvato desidrogenase (PATANÈ *et al*, 2000).

Outra proposta do mecanismo de ação da metformina é sugerida por Zhou *et al*, (2001), ao estudar os efeitos dessa droga sobre a ativação de AMPK (proteína quinase ativada por AMP). AMPK é uma subunidade alvo capaz de mediar os efeitos metabólicos da metformina. A clivagem desta quinase é uma etapa regulatória na biossíntese de lipídeos, fosforilando e inativando enzimas chaves como a acetil-CoA carboxilase. A AMPK também regula o metabolismo de ácidos graxos e conseqüentemente, aumenta a captação de glicose (ciclo de Randle) e estimula a gliconeogênese pela estimulação da glicose-6-fosfato-fosfatase (G-6P). A ativação

crônica de AMPK também induz a expressão da hexoquinase e de transportadores GLUT4 reproduzindo os efeitos proporcionados pela prática de exercícios físicos.

Todavia, o tratamento com metformina não é isento de efeitos colaterais. Estudos demonstraram que a metformina, em altas doses, pode reduzir a responsividade das células  $\beta$  ao aumento de glicose e em caso de exposição prolongada pode resultar em apoptose (KEFAS *et al*, 1997). Além disso, foram observados que cerca de 20% dos pacientes, no início do tratamento, relataram desconforto abdominal, sabor metálico, náuseas, anorexia e diarreia. Segundo Hermann (1996) e Scarpello, Hodgson e Howlett (1998), a diarreia pode refletir um distúrbio na absorção de sais biliares. Distúrbios gastrintestinais, tais como a diarreia, são frequentes e dessa forma, a absorção intestinal de vitamina B, especialmente o folato, é prejudicado durante terapia crônica. Esta deficiência pode levar ao aumento dos níveis de homocisteína que acelera a progressão das doenças vasculares. O aumento dos níveis de homocisteína é associado ao aumento de mortalidade de pacientes com doença cardiovascular aterogênica (FISMAN *et al*, 2004). Apesar da rápida excreção urinária com meia vida plasmática entre 1,5 e 4,5 horas (HOWLETT e BAILEY, 1999), há risco de acidose láctica (1 caso por 10 000 pacientes/ano). Por esta razão, esta droga não é recomendada a pacientes com deficiências hepáticas e renais.

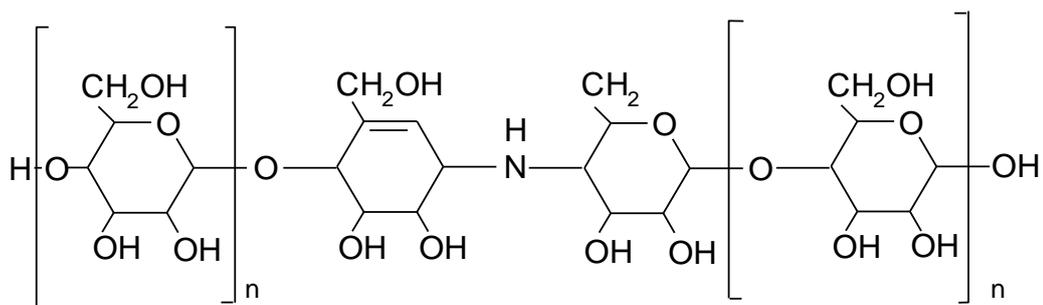
Quanto à glicemia e hemoglobina glicosilada, a associação de metformina com glibenclamida possibilitou o aproveitamento de suas respectivas propriedades favoráveis e o seu emprego conjunto foi sugerido por diversos pesquisadores (BAILEY e TURNER, 1996; HERMANN, 1996; LEITER, 1996; BAILEY, 2000) e inclusive o grupo UKPDS (United Kingdom Progressive Diabetes Study, 1998) durante pesquisa de ampla abrangência.

A associação de metformina com glibenclamida promoveu a diminuição de 25 a 30 % da concentração da glicose plasmática e também diminuiu entre 16 e 27 %, a concentração de hemoglobina glicosilada (EMILIEN, MALOTEAUX e PONCHON, 1999). Também foi observado que estes medicamentos produziram efeitos benéficos em doenças micro e macro-vasculares.

## Inibidores de $\alpha$ -glicosidase

A acarbose (Desenho 5) é um inibidor de  $\alpha$ -glicosidase não absorvível, que bloqueia a absorção de amido, sacarose e maltose, através do bloqueio enzimático envolvido no processo de digestão de carboidratos complexos. O resultado é diminuição no incremento dos níveis de glicose, reduzindo o pico glicêmico pós-prandial, mantendo normoglicemia, estabilizando o peso e protegendo as células  $\beta$ , evitando hiperinsulinemia. Está indicada para o tratamento do diabetes tipo 2 recém-diagnosticado, ou em associação com outros antidiabéticos orais nos casos de diabetes tipo 2 de longa duração (VILLAR, CASTELLAR e MOURA, 1999). No UKPDS, os dados para acarbose em associação mostraram redução sustentada da hemoglobina glicosilada. A acarbose deve ser administrada imediatamente antes das refeições, junto à primeira porção de alimento a ser ingerida (RAMALHO, 2002).

Os efeitos adversos são predominantemente gastrointestinais (flatulências, meteorismo e, eventualmente, diarreia), sendo controlados com ajuste de dose e dieta. Não há descrição de efeitos tóxicos com acarbose. Doses de 600 mg/dia podem aumentar enzimas hepáticas. Suas contra-indicações incluem diabetes tipo 1 gravidez e lactação. No paciente com diabetes tipo 2, em uso de insulina, também não é indicado o uso da acarbose e, principalmente, se ocorrer hipoglicemia; lembrar que a sacarose não será devidamente digerida e absorvida e portanto, não deverá ser usada para tratar a hipoglicemia devido à acarbose, devendo-se usar nessa circunstância a glicose (RAMALHO, 2002).

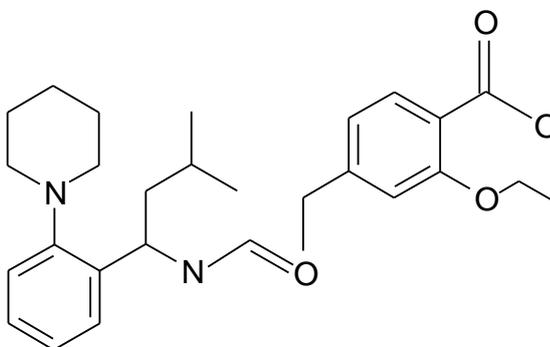


**Desenho 5:** Fórmula estrutural da acarbose, um inibidor de  $\alpha$ -glicosidade. Fonte: Pérez *et al.*, 2008

## Repaglinida

É um antidiabético oral do grupo dos hipoglicemiantes orais derivados do ácido carbamoilmetil benzóico, o primeiro de uma nova classe de compostos antihiperlipidêmicos. É um regulador prandial da glicemia. Sua ação consiste no aumento da secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas. Essa ação tem sido demonstrada como glicose dependente, ou seja, na ausência de glicose, não ocorre secreção de insulina. O pico de secreção de insulina ocorre entre 60 e 90 minutos após a administração da repaglinida, retornando aos níveis basais em 3 horas. É administrada em esquema relacionado à refeição, permitindo ao paciente um esquema de vida mais flexível. A dose de repaglinida só é usada se o paciente alimentar-se, tendo originado o conceito “uma refeição, uma dose – sem refeição, sem dose”. É metabolizada no fígado e possui eliminação biliar (RAMALHO, 2002).

A repaglinida (Desenho 6) difere das sulfonilureias, quanto ao estímulo à secreção de insulina, pelos seguintes motivos: age em receptores diferentes; apresenta um tempo de ação mais curto, possibilitando controle mais efetivo da hiperglicemia pós-prandial; tempo de ação curto, prevenindo a hipoglicemia no intervalo entre as refeições. Pode ser usada em monoterapia ou associada à metformina ou às sulfonilureias, com menor incidência de hipoglicemia (RAMALHO, 2002).



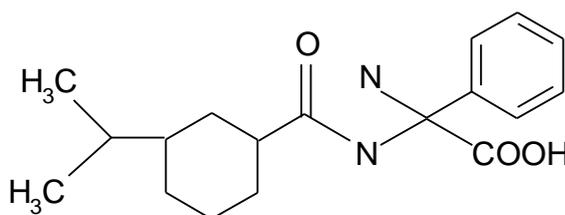
**Desenho 6:** Fórmula estrutural da repaglinida, um regulador prandial da glicemia, derivado do ácido carbamoilmetil benzóico. Fonte: Pérez *et al.*, 2008

## Nateglinida

É um derivado da D-fenilalanina que atua através do aumento da sensibilidade da célula  $\beta$  à glicose plasmática. O desenho 7 mostra a sua estrutura química. É também um regulador prandial da glicemia que se liga a receptores na célula  $\beta$  diferentes dos receptores das sulfonilureias. Sua absorção gastrointestinal é rápida, devendo ser administrada minutos antes das refeições. Reduz a excursão pós-prandial da glicemia sem provocar hipoglicemias (RAMALHO, 2002).

O mecanismo de ação da nateglinida é similar à repaglinida. Seu tempo de ação é 3 vezes mais rápido que o da repaglinida (DEVINENI, McLEOD e PRASAD, 1998; KARARA, DUNNING e McLEOD, 1999). Em níveis glicêmicos normais, durante o jejum, a nateglinida uma estimulação mínima na secreção de insulina (DEVINENI, McLEOD e PRASAD, 1998).

Pode ser usada em monoterapia ou associada à metformina ou às sulfonilureias, com menor incidência de hipoglicemia (RAMALHO, 2002).

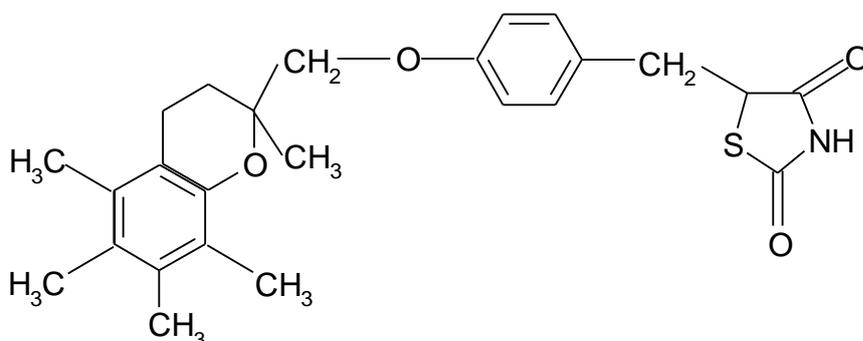


**Desenho 7:** Fórmula estrutural da nateglinida, um regulador prandial da glicemia, derivado da D-fenilalanina. Fonte: Pérez *et al.*, 2008

## Tiazolinedionas

Consiste numa nova classe de drogas que agem aumentando a ação da insulina, promovendo utilização da glicose nos tecidos periféricos, provavelmente pela estimulação do metabolismo oxidativo da glicose no músculo, e suprimindo gliconeogênese no fígado. Não tem efeito na secreção de insulina. Sua ação é atribuída ao estímulo de uma nova classe de receptores nucleares, os receptores ativadores de peroxissomo proliferativo (PPAR-Y), que aumentam expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo da glicose e lipídeos (RAMALHO, 2002).

A troglitazona (Desenho 8), assim como outras tiazolinodionas em estudo clínico, tem mostrado reduzir a resistência à insulina e a tolerância à glicose em obesos como também em não-obesos ou ainda em obesos com diabetes tipo 2, sem induzir aumento de peso ou hipoglicemia (RAMALHO, 2002).



**Desenho 8:** Fórmula estrutural da troglitazona, um hipoglicemiante da classe das tiazonodionas. Fonte: Pérez *et al.*, 2008

### 1.1.5 Diabetes melito e estresse oxidativo

O estresse oxidativo e os danos teciduais resultantes são marcas de doenças crônicas e o diabetes não é exceção. Como já foi mencionado anteriormente, a resistência à insulina ou a falta absoluta da mesma, resulta no comprometimento do controle metabólico da glicemia, culminando com um quadro de hiperglicemia que é considerado o fator de risco clássico para o desenvolvimento das chamadas complicações do diabetes (TIWARI, 2002).

Atualmente, existe um crescente interesse no estudo da contribuição do estresse oxidativo para desenvolvimento das complicações em diabetes melito. A origem deste estresse pode ser devido ao aumento da concentração de substâncias redutoras e/ou inclinadas a gerar peróxido de hidrogênio e radicais livres, como é o caso da glicose (BAYNES, 1991).

A glicose e outros  $\alpha$ -hidroxialdeídos são oxidados na presença de metais de transição, gerando peróxido de hidrogênio, intermediários reativos, radical hidroxil e cetoaldeídos (WOLFF e DEAN, 1987).

De acordo com Hunt, Smith e Woff (1990), algumas complicações no quadro do diabetes devem derivar do estresse oxidativo em tecidos catalisado pela descompartimentalização dos metais de transição, tais como cobre, ferro e manganês, metais envolvidos diretamente na oxidação de várias moléculas. Nesse caso, se o nível de metais de transição for maior que dos substratos oxidáveis, como a glicose e seus produtos de glicação, os redutores biológicos (lipídeos, grupos tióis e ácido ascórbico) serão oxidados, gerando um extenso estresse oxidativo (WOLFF, 1993).

São considerados três mecanismos bioquímicos principais envolvidos na patogênese da hiperglicemia e a relevância de cada um deles tem sido estudada em modelos animais e cultura de tecidos (ROCHA *et al.*, 2006):

1 - Formação de produtos finais da glicação avançada e/ou auto-oxidação de monossacarídeos (AGE): promovem modificações das proteínas plasmáticas e lipídeos associados, assim como também de proteínas de membrana e de tecidos. Há evidências de que esses processos estejam relacionados à rigidez prematura das artérias e articulações, assim como diminuição da capacidade vital dos pulmões que ocorrem no diabetes. A glicação também seria um fator de risco para o desenvolvimento de catarata e aterosclerose (WOLFF E DEAN, 1987; HARDING e BESWICK, 1988; WOLFF e DEAN, 1988; BROWNLEE, 1995).

O acúmulo desses produtos finais de glicação avançada é comum no processo de envelhecimento, na aterosclerose e no diabetes e está associado, especialmente, a proteínas de vida longa como o colágeno, o cristalino e proteínas dos nervos (YIM *et al.*, 1995).

2 - Aumento do fluxo através da via dos polióis: o aumento nos níveis de glicose leva a um aumento da atividade das enzimas aldose-redutase e sorbitol-desidrogenase e, conseqüentemente, acúmulo intracelular de sorbitol e frutose, além de uma diminuição na relação NADPH/NADP<sup>+</sup> e um aumento na relação NADH/NAD (SCHMIDT e STERN, 2000; PFAFFLY, 2001; ZHAO, 2001).

O estresse osmótico causado pelo acúmulo de sorbitol parece ser o fator mais importante para o desenvolvimento da catarata diabética. O aumento nos níveis de frutose leva a um aumento na formação de seus derivados frutose-3-fosfato e 3-deoxiglicosonas que são agentes da glicação não enzimática mais potentes do que a glicose e, portanto, o fluxo de glicose na via dos polióis pode aumentar a formação de AGEs. As mudanças nas relações NADPH/NADP<sup>+</sup> e NADH/NAD<sup>+</sup> causam alterações em vários sistemas celulares. A depleção no estoque de NADPH das células pode inibir outras enzimas que sejam dependentes dessa coenzima como o sistema glutaciona redox (reciclagem de GSH) e NO-sintase (formação de óxido nítrico) (ROCHA *et al.*, 2006).

A diminuição dos níveis de GSH aumenta a suscetibilidade das células endoteliais à ação do  $H_2O_2$  e citotoxicidade de xenobióticos (sistema citocromo  $P_{450}$  também fica comprometido) (GIUGLIANO, CERIELLO e PAOLISSO, 1996).

3 - Ativação de isoformas de proteína C quinase: alguns estudos mostram que o aumento nos níveis de glicose ativa a via de síntese de novo de diacilglicerol (DAG), que, por sua vez, ativa várias isoformas de proteína C quinase (PKC) que são sinalizadores intracelulares importantes e estão envolvidos na regulação de muitas funções vasculares (ROCHA *et al.*, 2006).

A ativação de PKC, induzida pela glicose leva a um aumento na produção de matriz celular e citocinas, assim como uma exacerbação da contratilidade, permeabilidade e proliferação celular vascular, ativação de fosfolipase  $A_2$  citosólica e inibição de ATPase dependente de  $Na^+/K^+$ . Esses processos estão associados a várias anormalidades nos tecidos renal, cardiovascular e na retina (KOYA e KING, 1998).

Segundo Wajchenberg (2002), esses três mecanismos principais, responsáveis pelos danos oxidativos hiperglicêmicos, na verdade, estariam interligados e associados a um aumento na formação de espécies reativas do oxigênio (estresse oxidativo).

Assim, os pesquisadores propõem que o uso de antioxidantes preveniria o desenvolvimento e a progressão das complicações do diabetes (BAYNES, 1991; NISHIKAWA *et al.*, 2000; SCHMIDT e STERN, 2000).

Kaneto *et al.* (1996) provaram que as espécies reativas de oxigênio (ERO's) conduzem a um dano nas células  $\beta$  pancreáticas por meio da indução da apoptose e supressão da biossíntese da insulina. As células  $\beta$  são particularmente susceptíveis aos efeitos deletérios de ERO's, uma vez que essas células possuem baixa expressão de genes de enzimas antioxidantes, quando comparado a outros tecidos (LENZEN, DRINKGER e TIEDGE, 1996; ZHANG, OLLINGER e BRUNK, 1995). Dessa forma, o *status* antioxidante é um determinante importante na suscetibilidade ao estresse oxidativo (EL-ALFY, AHMED E FATANI, 2005).

#### 1.1.6 Complicações do diabetes melito

A entrada da glicose no cérebro e no tecido nervoso periférico, rins, intestino, cristalino e hemácia, ocorre através da fixação não enzimática da glicose nas moléculas de proteínas, que por sua vez, numa sequência de ligações cruzadas entre as proteínas, formam um complexo conhecido como produtos finais da glicosilação avançada (AGE). A formação do AGE "enrijece" a matriz extracelular, reduz a elasticidade da parede arterial e também interfere na função das células endoteliais, dos fagócitos e das células da musculatura lisa na parede dos vasos sanguíneos, contribuindo assim para as doenças crônicas (BAYNES e DOMINICZAK, 2000).

Na nefropatia diabética ocorre um espessamento da membrana basal capilar glomerular, discreto aumento da matriz mesangial e glomeruloesclerose. A nefropatia diabética é a causa mais comum de insuficiência renal crônica terminal (GIUGLIANO, CERIELLO e PAOLISSO, 1996).

Outra complicação é o desenvolvimento de retinopatia, comum no diabético, devido às alterações vasculares na retina. A presença de microaneurismas, hemorragias, exsudatos, oclusões de capilares e arteríolas, pode ser encontrada logo após o diagnóstico de diabetes tipo 2. Sua duração está relacionada ao tempo de permanência da doença, podendo levar à cegueira (KOYA e KING, 1998).

Uma das complicações mais traumáticas é o “pé diabético”. A glicose presente na corrente sanguínea é convertida em sorbitol pela ação da enzima aldose redutase, que penetra livre na célula e se acumula na bainha de Schwann do tecido nervoso. Isto provoca alterações na condução do impulso nervoso, devido à neuropatia sensitivomotora e à polineuropatia autonômica, levando a um déficit da sensibilidade dolorosa, tátil e térmica, frequentemente associada à pele seca, que facilmente racha propiciando infecção e ulceração no pé. A frequência de admissões hospitalares para amputação causada por diabetes é de cerca de 50 a 70 % do total de amputações não traumáticas (VILLAR, CASTELLAR e MOURA, 1999).

Ainda o excesso de açúcar no sangue provoca um aumento da agregação plaquetária, levando ao aparecimento de microtrombos que, junto com a AGE, são os principais fatores relacionados às complicações macrovasculares, como hipertensão arterial e cardiopatias, que são as principais causas de morbimortalidade (ORTEGA, 2005).

### 1.1.7 Modelos de indução de diabetes melito

Diabetes melito pode ser induzido em animais, por vários mecanismos. Porém, em um grande número de métodos, o agente utilizado não é capaz de desenvolver toda a fisiopatologia do diabetes humano. Os principais mecanismos de indução são estresse, infecções, toxinas, ou manipulações, incluindo a pancreatectomia, lesões do sistema nervoso central, uso de hormônios anti-insulínicos, exposição à hidrocortisona, indução por vírus e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos (LERCO *et al.*, 2003).

Os métodos químicos de supressão endócrina do pâncreas exibem a maior parte dos eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos que ocorrem durante e após a indução do estado diabetogênico. A utilização de drogas para indução do diabetes é uma das técnicas mais antigas empregadas. Entre as substâncias mais citadas pela literatura destacam-se a estreptozotocina e o aloxano (RIBEIRO, 2008). Essas drogas causam insuficiência insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento do diabetes permanente nas 24 horas subsequentes. Esses métodos químicos, apesar de terem um elevado índice de mortalidade relativa, são de fácil execução e permitem a utilização de um grande número de animais, destruindo a parte endócrina (ilhotas pancreáticas, produtoras de hormônios como insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático) do pâncreas, com preservação de sua função exócrina (glândula acinosa composta, responsável pela secreção de água, íons, além da secreção de enzimas digestivas no duodeno), tendo, ainda, a vantagem de estarem padronizados na maioria dos laboratórios experimentais (LERCO *et al.*, 2003).

A estreptozotocina (2 – deoxi – 2, 3 – metil – 3 - nitrosoureído - D-glicopirranose) (STZ) é sintetizada pelo *Streptomyces achromogenes*. Foi uma das primeiras drogas a ser utilizada para estudo do diabetes melito, tanto do tipo 1 quanto do tipo 2. No caso do tipo 2, a droga é administrada, em dose única em animais neonatos. A via de administração pode ser intravenosa ou intraperitoneal, a dose pode variar de 30 a 200 mg/kg, sendo que os animais submetidos à aplicação desta droga adquirem diabetes tipo 2 na idade adulta (ABDEL-BARRY, ABDEL-HASSAN e AL-HAKIEM, 1997; WANG *et al.*, 1998). Para indução do diabetes tipo 1 são usadas, frequentemente, doses entre 40 e 60 mg/kg, administradas IV em ratos e camundongos adultos. Doses mais elevadas são também usadas. A STZ é também eficaz após a administração intraperitoneal, utilizando-se uma dose similar ou mais elevada, mas uma única dose abaixo de 40 mg/kg pode ser ineficaz (MACEDO *et al.*, 1987; LERCO *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2004).

De forma semelhante à estreptozotocina, o aloxano também é uma droga utilizada para a indução dos dois tipos de diabetes. No tipo 2, essa droga lesa as células  $\beta$  pancreáticas e os animais adquirem sintomas da doença no início da fase adulta (com três meses de idade) (SZKUDELSKI, 2001).

A estreptozotocina (STZ) apresenta maior especificidade às células  $\beta$ , com sua ação vinculada à dose de administração e com menor toxicidade geral que o aloxano, o qual exibe estreita margem de segurança entre as doses diabetogênicas e letais. Porém tem-se observado que uma tendência pela escolha do uso de aloxano, apesar de sua menor especificidade e estreita margem de segurança. Duas razões levam a essa escolha: a primeira, de ordem econômica, dado o alto custo da STZ, quando comparado com o do aloxano; a segunda, pelo uso amplamente difundido do aloxano na produção do diabetes experimental por inúmeros serviços de larga experiência no assunto (GUPTA *et al.*, 2004).

## O mecanismo de ação do aloxano

O aloxano (2, 4, 5, 6 – tetrapirimidino, 5, 6 – dioxiuracil) é um derivado do ácido úrico. Já em 1943, Dunn, Scheehan e Mc Lethic, descreveram necroses específicas nas ilhotas pancreáticas causadas por aloxano em coelhos. Desde então, o aloxano vem sendo utilizado para indução de modelos de diabetes. Essa substância exerce sua ação diabetogênica quando administrado pela via parenteral: intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) ou sub-cutânea (SC). A dose necessária para a indução depende da espécie de animal, via de administração e estado nutricional. As ilhotas humanas são consideradas mais resistentes ao aloxano que as de ratos e camundongos (LERCO et al., 2003).

O mecanismo de ação do aloxano foi estudado intensivamente, predominantemente “in vitro”, e é caracterizado agora completamente. Usando ilhotas isoladas e perfusão de pâncreas de camundongos, demonstrou-se que o aloxano promove uma ascensão repentina na secreção de insulina, na presença ou na ausência de glicose. Este fenômeno apareceu imediatamente depois do tratamento com aloxano e não foi observado após a exposição repetitiva das ilhotas a este agente diabetogênico. A ascensão repentina na concentração de insulina do sangue foi observada também “in vivo” imediatamente depois da injeção do aloxano aos camundongos. A liberação aloxano-induzida de insulina é, entretanto, de duração curta e é seguida pela supressão completa da resposta das ilhotas à glicose, mesmo quando as concentrações elevadas deste açúcar foram usadas (SZKUDELSKI, 2001).

O aloxano é uma substância hidrofílica e instável. Sua meia-vida no pH neutro e a 37 °C é aproximadamente 1,5 minutos, podendo ser mais longa em temperaturas mais baixas. Entretanto, quando uma dose diabetogênica é usada, o tempo de decomposição do aloxano é suficiente para permitir que alcance o precedida por sua recaptção rápida pelas células  $\beta$ . A rápida recaptção pelas células secretoras de insulina foi proposta como uma importante característica que determina a diabetogenicidade do aloxano (LENZEN e PANTEN, 1988).

A ação tóxica do aloxano sobre as células  $\beta$  pancreáticas está relacionada com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), após o processo de auto oxidação do ácido dialúrico, resultando na fragmentação do DNA destas células (SOTO *et al.*, 1998). Uma recaptação similar do aloxano ocorre também no fígado. Entretanto, o fígado e outros tecidos são mais resistentes às espécies reativas de oxigênio em comparação às células  $\beta$  pancreáticas, e esta resistência protege-as, parcialmente, da toxicidade do aloxano (SZKUDELSKI, 2001).

Outro mecanismo envolvido na sua ação diabetogênica é a inibição da enzima glicoquinase, enzima que promove a interação entre a secreção de insulina e a concentração de glicose, através da oxidação dos grupos tiol (SH) presentes no sítio de ligação da enzima, sendo esta uma reação reversível (LERCO *et al.*, 2003).

Muitos já sugeriram que a seletividade da ação do aloxano não é completamente satisfatória. As experiências recentes confirmaram esta objeção. A dose diabetogênica do aloxano origina uma diminuição dos grupos SH, acompanhada por um aumento simultâneo na atividade da glutathione peroxidase no fígado de camundongos dois minutos após sua administração. Ao mesmo tempo, a concentração de insulina no sangue elevou-se acentuadamente. Esta insulinemia exagerada não estimula, entretanto, nenhuma redução significativa da glicose no sangue, o que sugere a sensibilidade periférica danificada da insulina no tempo curto após o tratamento do aloxano. Observou-se também que a lipólise basal e induzida por epinefrina é intensificada por aloxano em adipócitos isolados de camundongos, e a insulina não restringiu este efeito (SZKUDELSKI, 2001).

O jejum também tem um papel importante na resposta das espécies aos agentes diabetogênicos. Noventa e cinco por cento dos camundongos tratados com aloxano, administrado com o animal em jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos. A administração de uma dose similar de aloxano, quando o jejum não é observado, diminui essa resposta para 25%. Isso ocorre porque o aloxano entra na célula pancreática através do receptor de glicose GLUT-2. Então em estados de jejum, esses receptores estão livres para que haja ligação de moléculas de aloxano a eles (LERCO *et al.*, 2003).

A importância do peso em relação à susceptibilidade do animal aos efeitos tóxicos também é considerada. Um estudo detalhado em camundongos revelou que a toxicidade do aloxano altera-se numa relação linear com o peso do animal (SZKUDELSKI, 2001).

## 1.2 O USO DE PLANTAS HIPOGLICEMIANTES

Conforme revisado acima, o diabetes melito engloba uma série de alterações metabólicas que acarretam um estado crônico de hiperglicemia. Nos últimos anos observou-se que alguns fatores contribuíram para a diversificação de recursos no tratamento do diabetes, como a crise econômica e o alto custo de medicamentos. A fitoterapia é um método que pode ser utilizado e indicado, como uma fonte de fácil aquisição e baixo custo, para o tratamento de enfermidades, dentre elas o diabetes. No Brasil existem muitas plantas com ação hipoglicemiante oferecendo, assim, potencial para a pesquisa científica que validem o seu uso com eficácia e segurança (CARREIRA *et al.*, 2007).

A fitoterapia é um recurso alternativo muito útil nos programas de atenção primária de saúde quando são utilizadas plantas cujas propriedades terapêuticas tenham sido justificadas cientificamente, propiciando melhoria da saúde dos usuários, com produtos de baixo custo e resgatando valores da cultura popular. Entretanto torna-se de extrema importância que estes usuários recebam orientação adequada de seu prescritor para que haja uma utilização de forma correta e racional dos medicamentos fitoterápicos (CARREIRA *et al.*, 2007).

Muitas espécies de plantas são conhecidas na medicina popular de diferentes culturas pelas propriedades hipoglicemiantes e pelo uso crescente no tratamento do diabetes (ABDEL-BARRY, ABDEL-HASSAN e AL-HAKIEM, 1997). Apoiado no conhecimento e uso popular, a pesquisa e a comprovação dos efeitos e dos constituintes dessas plantas tornam esta área cientificamente atrativa. Este

crescimento deve-se ao fato de que as substâncias encontradas nestas plantas possam servir como agentes hipoglicemiantes que mimetizam o efeito da insulina. Dessa forma, estas substâncias poderiam substituir as dolorosas injeções de insulina, alívio na vida dos diabéticos do tipo 1, minimizariam os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais no caso dos diabéticos do tipo 2 e também diminuiriam os elevados custos do tratamento (De SOUSA, 2002).

Observa-se, no entanto, um descrédito por parte dos profissionais de saúde quanto ao potencial terapêutico dos vegetais tidos popularmente como hipoglicemiantes. Entretanto, muitos dos seus pacientes persistem na sua utilização, muitas vezes associada à medicação tradicional, o que pode resultar em sérios riscos à saúde dos usuários, via potencialização de efeitos ou toxicidade (BORGES, BAUTISTA e GUILERA, 2008).

Diante dessa realidade, muitas espécies de plantas têm sido testadas para tratar os sintomas do diabetes melito (HANDA e CHAWLA, 1989; IVORRA, PAYÁ e VILLAR, 1989; RAHMAN e ZAMAN, 1989; JOHNS e CHAPMAN, 1995; MARLES e FARNSWORTH, 1995; NEEF, DECLERQ e LAEKEMAN, 1995; OLIVEIRA, 1995; ERNST, 1997; PEREIRA, 1997; LAMBA *et al.*, 2000; NOVAES *et al.*, 2001; GROVER, YADAV e VATS, 2002; McCUNE e JONHNS, 2002; SAID *et al.*, 2002; SYEM *et al.*, 2002; VOLPATO *et al.*, 2002; HUO, WINTERS e YAO, 2003; KAR, CHAUDHARY e BANDYOPADHYAY, 2003; ELDER, 2004; SAXENA e VIKRAM, 2004). Estas plantas representam mais de 725 gêneros em 183 famílias, estendendo-se fisiologicamente das algas marinhas e fungos para plantas, tais como as compostas. A distância filogenética entre este grupo de famílias é forte indicação da natureza variada de seus constituintes ativos (IVORRA, PAYÁ e VILLAR, 1989; MARLES e FARNSWORTH, 1995; JOHNS e CHAPMAN, 1995; PEREIRA, 1997; PÉREZ GUTIÉRREZ, 1998, 2002; LAMBA *et al.*, 2000). Na medicina chinesa tradicional, 82 plantas medicinais têm sido usadas como medicamentos naturais para o tratamento do diabetes melito e suas complicações (LI *et al.*, 2004). A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas ao serem avaliadas farmacologicamente demonstraram ter atividade hipoglicemiante e possuir constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Entretanto, análises posteriores revelaram grande variedade de

mecanismos de ação que podem levar ao efeito hipoglicemiante, nem todos terapeuticamente úteis (MARLES e FARNSWORTH,1995; HUO, WINTERS e YAO, 2003; SAID *et al.*, 2002).

A pesquisa de espécies com potencial hipoglicemiante conhecidas na medicina popular, almeja a comprovação dos efeitos, a caracterização dos constituintes fitoquímicos e o esclarecimento dos mecanismos de ação destes compostos. Como perspectiva desses estudos, está o desenvolvimento de novos fármacos a partir de compostos naturais com comprovada atividade hipoglicêmica e até mesmo a utilização dos compostos nas mais variadas formulações (complexados ou não) como adjuvantes ao tratamento do diabetes (CAZAROLLI, 2004).

#### 1.2.1 Produtos naturais hipoglicemiantes e principais mecanismos de ação

O mecanismo de ação pelos quais as plantas diminuem a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células  $\beta$ -pancreáticas, aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina, diminuição da perda de glicogênio, aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos, eliminação de radicais livres, resistência à peroxidação de lipídeos, correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (MARLES e FARNSWORTH,1995; SAID *et al.*, 2002 ; VOLPATO *et al.*, 2002; HUO, WINTERS e YAO, 2003; LI *et al.*, 2004).

Há muitas substâncias extraídas de plantas que reduzem o nível de glicose no sangue e a grande variedade de classes químicas indica que uma gama de mecanismos de ação deve estar envolvida nesse processo. Algumas destas substâncias podem ter potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia como efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade (IVORRA, PAYÁ e VILLAR, 1989; PÉREZ GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; LAMBA *et al.*, 2000; PÉREZ GUTIÉRREZ, 2002).

Assim, derivados fenólicos de plantas, como catequinas, epicatequinas, epigallocatequinas, ácido tânico e isoflavonas exercem atividade inibitória, por exemplo, sobre enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase, contribuindo para a atividade supressora da hiperglicemia pós-prandial de alguns produtos de origem vegetal (YOSHIKAWA *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2000a; TIWARI e RAO, 2002; BAWDEN *et al.*, 2002 e 2003; ALI, RAMAN e HOUGHTON, 2003). Vários derivados fenólicos, glicosilados ou não, mostraram ainda potente atividade inibitória sobre as enzimas aldose-redutase (YOSHIKAWA *et al.*, 1998) e outros mostraram inibir a absorção de glicose dependente de sódio nas paredes intestinais de ratos (WELSCH; LACHANCE e WASSERMAN, 1989).

Alguns derivados polifenólicos também inibem, o transporte de glicose através do intestino pela inibição do co-transportador de glicose dependente de sódio - S-GLUT1 (KOBAYASHI *et al.*, 2000b).

Frações ricas em saponinas demonstraram atividade inibitória sobre S-GLUT<sub>1</sub>, assim como algumas isoflavonas da soja (MUKHERJEE *et al.*, 1996; VALSA, SUDHEESH e VIJAYALAKSHMI, 1997; LAU *et al.*, 1998; TIWARI e RAO, 2002). Vários estudos têm sido realizados sobre a relação estrutura-atividade de saponinas isoladas de várias plantas e sua atividade hipoglicemiante (YOSHIKAWA *et al.* 1996 e 1997a e b, MATSUDA *et al.*, 1998).

Estudos realizados demonstraram que o efeito antidiabético das fibras hidrossolúveis galactomanana de *Trigonella foenum graecum* L. e o da pectina e polissacarídeos de plantas parecem estar relacionados com o aumento da viscosidade do conteúdo gastrointestinal, diminuindo assim a velocidade de esvaziamento gástrico e suprimindo ou retardando a absorção de carboidratos no processo digestivo (AL-HABORI e RAMAN, 1998; TIWARI e RAO, 2002).

A capacidade de regeneração das células  $\beta$  pancreáticas e o estímulo para a liberação de insulina por essas células foram demonstrados para o extrato bruto de *Pterocarpus marsupium*, sendo essas atividades atribuídas a epicatequina e a alguns flavonóides, como liquiritigenina e pterosurpina, isolados dos extratos brutos (JAHROMI, RAY e CHANSOURIA, 1993; TIWARI e RAO, 2002).

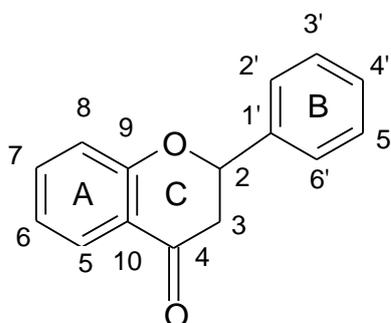
Da Silva e Filho (2002) fizeram uma revisão dos aspectos químicos e farmacológicos de várias espécies do gênero *Bauhinia* as quais são descritas na medicina popular como antidiabéticas. Eles observaram que algumas espécies já tiveram seus efeitos hipoglicemiantes comprovados em laboratório como é o caso de *Bauhinia divaricata*, *B. candicans* e *B. forficata*. Os flavonóides presentes no extrato hidroalcoólico de *B. variegata* também foram registrados como hipoglicemiantes em ratos com diabetes induzido por streptozotocina.

## **Compostos fenólicos**

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológica e antinutricional, por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEM, ALBUQUERQUE e MIRANDA, 1992; GAMACHE, RYAN e ACWORTH, 1993; AZIZ *et al.*, 1998; FERNANDEZ, SAENZ, GARCIA, 1998; HOLLMAN e KATAN, 1998), além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG, BODINE e NOBLE, 1998).

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos, e susceptíveis à ação de enzimas (KING e YOUNG, 1999).

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis de ocorrência natural frequentemente encontrados em várias plantas, frutas e vegetais. A maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono no núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas ( $C_6 - C_3 - C_6$ ). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o núcleo B (Desenho 9). Os flavonóides apresentam-se frequentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (heterosídeo) (PIETTA, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001).



**Desenho 9:** Núcleo fundamental dos flavonóides. Fonte: Cazarolli, 2004.

São conhecidos mais de 4200 flavonóides, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. São divididos em várias classes de acordo com o grau de oxidação do oxigênio heterocíclico e com o modelo de substituição no anel C, como exemplo: flavonóis, isoflavonas, catequinas, flavanonas, flavonas, C-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas entre outras (PIETTA, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001; TAPIERO *et al.*, 2002).

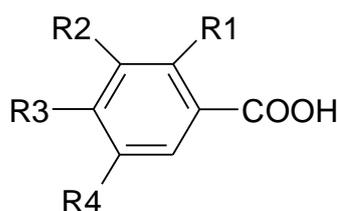
Os flavonóides consumidos a partir da dieta são absorvidos no estômago e intestino. São metabolizados principalmente no fígado, sendo a mucosa intestinal, túbulos renais, pulmão, pele e placenta sítios secundários de metabolização. Os metabólitos são excretados na urina e fezes (ONG e KHOO, 2000).

Recentemente, as aplicações terapêuticas dos flavonóides no tratamento e prevenção de doenças em humanos são demonstradas em vários estudos. Entre as aplicações médicas melhor documentadas estão o uso no tratamento e prevenção de alergias, asma e inflamação. Os efeitos benéficos também estão relacionados em doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata diabética e cirrose (ONG e KHOO, 1996). Apresentam ainda, propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, anti-trombóticas e antivirais (SAIJA *et al.*, 1995; ONG e KHOO, 2000; SIMÕES *et al.*, 2001; VESSAL, HEMMATI e VASEI, 2003).

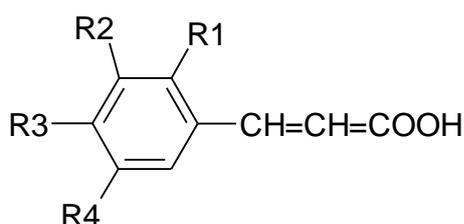
Vários polifenóis naturais demonstram efeitos antidiabéticos e investigações do mecanismo de ação estão em desenvolvimento. Exemplos de flavonóides com ação anti-hiperglicêmica comprovados são: a (-)-epicatequina, que protege as ilhotas de Langerhans e promove a regeneração das células  $\beta$  nas ilhotas, estimula a liberação de insulina e normaliza os níveis de glicose sanguínea; a silimarina, com propriedades antioxidantes, atua protegendo as células  $\beta$  de danos oxidativos; a luteolina e o respectivo glicosídeo, que através da capacidade antioxidante e de sequestro de radicais livres contribui para a regeneração das células  $\beta$ ; a quercetina atua normalizando os níveis de glicose plasmática, aumentando o conteúdo de glicogênio hepático, induzindo as enzimas glicoquinase e hexoquinase hepáticas e reduzindo as concentrações de colesterol e LDL no soro. Também atua na regeneração das ilhotas pancreáticas, aumentando o número de ilhotas funcionais e a liberação de insulina (ZARZUELO *et al.*, 1996; SOTO *et al.*, 1998; VESSAL, HEMMATI e VASEI, 2003). Ainda, a miricetina, com atividades antiinflamatória, anticarcinogênica, antiviral e antidiabética. Exerce a função hipoglicemiante mimetizando as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influencia no metabolismo e estoque de glicogênio hepáticos (ONG e KHOO, 1996, 2000).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, o que lhes confere propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças, como diabetes (BRAVO, 1998; FERGUSON e HARRIS, 1999).

Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza; suas fórmulas gerais e denominações estão representadas na Desenho 10. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono ( $C_6-C_3$ ), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Desenho 11).



**Desenho 10:** Estrutura química dos ácidos benzóicos. Fonte: Soares, 2002



**Desenho 11:** Estrutura química dos ácidos cinâmicos. Fonte: Soares, 2002

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

### 1.2.2 O uso popular de plantas do gênero *Cecropia*

As tribos indígenas da Amazônia utilizam as plantas do gênero *Cecropia* (as embaúbas) para reumatismo, e inflamações do fígado e pulmões, explorando assim suas propriedades antiinflamatórias. As folhas geralmente são preparadas na forma de chás que são usados para tratamento de asma e outras afecções do aparelho respiratório. O chá das folhas das embaúbas é também usado para úlceras estomacais. Membros da tribo indígena Palikur, na Guiana, envolvem fraturas, contusões e feridas com as grandes folhas das embaúbas, além de utilizá-las para infecções genito-urinárias e no alívio da dor pós-parto (CONSOLINI *et al.*, 2006).

No Brasil, as plantas do gênero *Cecropia* são utilizadas em várias doenças do aparelho respiratório, tais como asma, bronquite, tosse, coqueluche e pneumonia. Existem também relatos de seu uso na medicina popular para o tratamento do diabetes, doença de Parkinson, perturbações do fígado, pressão alta e para aumentar a contratilidade do músculo cardíaco (CONSOLINI *et al.*, 2006).

Na Colômbia, as embaúbas são também consideradas efetivas no tratamento da doença de Parkinson, além de serem usadas como substituintes de plantas que contêm digitálicos, no tratamento de doenças cardíacas. O chá das folhas também é utilizado para facilitar menstruações e parto. Na medicina popular da Guatemala, as plantas do gênero *Cecropia* são indicadas para asma, edema, reumatismo, diabetes, febre, aterosclerose e gonorréia. No México, essas plantas são utilizadas popularmente para o tratamento do diabetes, tosse, inflamação, diarreia, afecções da bexiga, asma, obesidade, perturbações do fígado, pressão alta e verrugas (WRIGHT *et al.*, 2007).

Em Cuba, praticamente todas as partes da planta são utilizadas na medicina popular. O látex é considerado corrosivo e adstringente, sendo seu uso tópico indicado para remoção de verrugas e calos, e para tratar herpes (e outras infecções venéreas) e úlceras da pele. As cascas são usadas para reduzir muco; as raízes, para afecções biliares; e as frutas são consideradas emolientes, atuando como calmante e suavizante da pele. As folhas são utilizadas para redução de dor, asma, perturbações do fígado, edema e para facilitar menstruações (WRIGHT *et al.*, 2007).

Em outras partes da América Latina e também na Amazônia, as plantas do gênero *Cecropia* são frequentemente consideradas como a cura para asma após apenas algumas semanas de tratamento com o chá preparado a partir de suas folhas (WRIGHT *et al.*, 2007).

Na medicina francesa, o extrato de *Cecropia* sp foi muito utilizado para deficiências cardíacas e alívio da tosse, no século XX (GILBERT e MICHEL, 1920; CHERNOVIZ, 1927). Essas indicações já foram inclusive incorporadas no Formulário Farmacêutico Brasileiro, incluindo também o seu uso no tratamento de bronquite, dispnéia e asma (COIMBRA, 1958). O xarope de *Cecropia hololeuca* foi incluído na primeira Farmacopéia Brasileira. Já a infusão a 5% ou decocção de *Cecropia pachystachya* foi incluída na Farmacopéia Nacional Argentina, em 1978, devido ao seu extensivo uso popular (ALONSO, 1998).

### 1.2.3 Aspectos biológicos e farmacológicos de plantas do gênero *Cecropia*

Vários estudos farmacológicos têm sido desenvolvidos para explicar e confirmar alguns dos muitos usos de plantas do gênero *Cecropia* na medicina popular. Avaliações *in vitro* de extratos de *Cecropia* sp e seus efeitos induzidos após injeções intravenosas de extrato bruto dessas plantas foram relatados por Sivori, 1933; Vieira *et al.*, 1968; Vidrio *et al.*, 1982; Lacaille-Dubois, FRANCK e WAGNER, 2001; Almeida *et al.*, 2006; Consolini *et al.*, 2006. Suas ações farmacológicas sobre os sistemas cardiovascular e nervoso central após administração oral foram relatadas por Lapa *et al.*, em 1999. Cysneiros, 1996, usando músculos de traquéia avaliou os efeitos de *Cecropia glasiuvi* no sistema respiratório. Ainda para *Cecropia glasiuvi*, foram relatados seus efeitos antidepressivo (ROCHA *et al.*, 2007), de inibição de secreção de suco gástrico (SOUCCAR *et al.*, 2008), antihipertensivo (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007), broncodilatador (TANAE *et al.*, 2007) e inibição de broncoespasmo induzido por histamina (DELARCINA *et al.*, 2007). Ramos Almeida *et al.*, 2006, relataram as atividades hipotensora e vasorelaxante de *Cecropia lyratiloba*. Vargas Howell e Ulate Monteiro, 1996, demonstraram a atividade diurética de *Cecropia obtusifolia* em ratos. Para essa mesma espécie foram também relatadas as atividades hipoglicemiante (ANDRADE-CETTO e HEINRICH, 2005), antiinflamatória, analgésica e efeito depressor central (PÉREZ-GUERRERO *et al.*, 2001), além de sua atividade antioxidante (Silva *et al.*, 2007) e inibição de alfa-glicosidase (ANDRADE-CETTO, BECERRA-JIMÉNEZ e CÁRDENAS-VÁZQUEZ, 2008). *Cecropia peltata* apresentou atividade antimicrobiana (ROJAS *et al.*, 2006) e hipoglicemiante (ANDRADE-CETTO *et al.*, 2006).

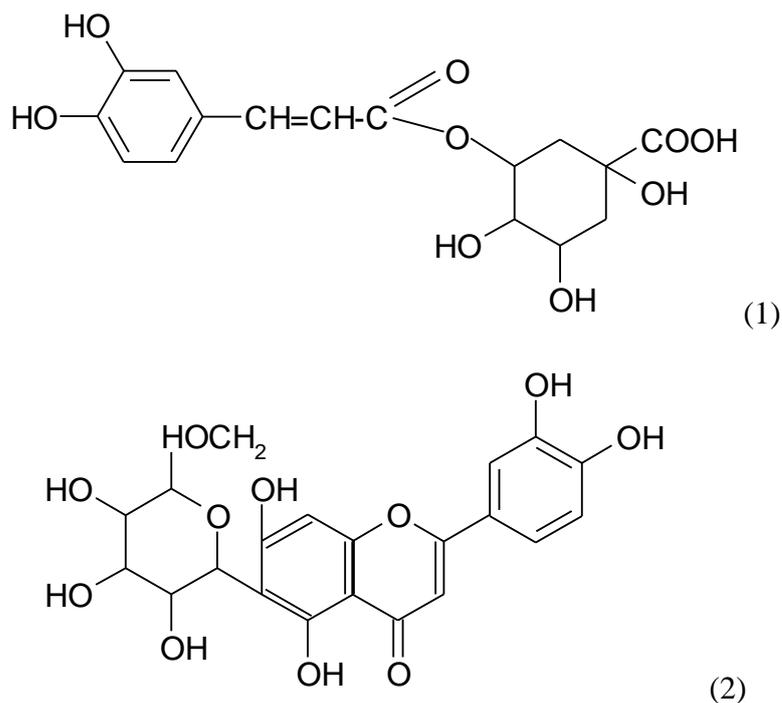
Já em 1925, Domínguez e Soto fizeram uma descrição qualitativa de *Cecropia pachystachya* em cães e coelhos, sugerindo sua atividade broncodilatadora e toxicidade cardíaca. Recentemente, foi demonstrado o efeito hipotensivo de duas plantas dessa mesma espécie que cresceram em regiões climática e fitogeograficamente diferentes, na Argentina. Uma cresceu em clima de floresta neotropical, e a outra, em região de clima temperado (CONSOLINI e MIGLIORI, 2005). Apesar de crescerem em climas diferentes, ambas as plantas

produziram efeito hipotensivo em ratos, porém apenas a espécie que cresceu na região de clima temperado causou taquicardia *in vivo* (CONSOLINI e MIGLIORI, 2005), sugerindo a diferença de composição entre os extratos de cada planta. O seu efeito cardiotônico foi confirmado por Consolini *et al*, 2006. Além disso, Consolini *et al.*, 2006, também demonstraram um potente efeito sedativo, comparado ao Diazepam<sup>®</sup> 10mg/kg. Esse efeito pode contribuir para explicar seu uso terapêutico na tosse e asma. Consolini e Migliori, 2005, constataram atividade diurética em ratos e Velázquez *et al.*, 2003 observaram a propriedade antioxidante *in vitro* de *Cecropia pachystachya*.

#### 1.2.4 Constituintes bioativos isolados de *Cecropia*

De uma forma geral, espécies do gênero *Cecropia* apresentam como principais constituintes glicosídeos, lipídeos, alcalóides, flavonóides, taninos, catequinas, procianidinas, triterpenos, polifenóis, esteróides e resinas (TANAE *et al.*, 2007).

Andrade-Cetto e Wiedenfeld, em 2001, fracionaram o extrato butanólico das folhas de *Cecropia obtusifolia* Bertol e identificaram dois constituintes que exerciam efeito hipoglicemiante: o ácido clorogênico e a flavona isoorientina, ilustrados na Desenho 12.



**Desenho 12:** Estrutura química do ácido clorogênico (1) e do flavonóide isoorientina(2). Fonte: Andrade-Cetto e Wiedenfeld, 2001

O ácido clorogênico é encontrado em uma gama de alimentos de origem vegetal (De MARIA e MOREIRA, 2004). A estrutura química para esse composto foi estabelecida por Fischer em 1932 como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como ácido 5-cafeoilquínico) (RIBEIRO, 2008). Ácido clorogênico e seus isômeros apresentam propriedades benéficas à saúde, não só devido à sua potente atividade antioxidante, mas também como agente hepatoprotetor, hipoglicemiante e antiviral (FARAH e DANANGELO, 2006).

A flavona isoorientina, além de sua atividade hipoglicemiante (ANDRADE-CETTO e WIEDENFELD, 2001), já teve testadas suas atividades antimicrobiana e antiespasmódica (AFIFI, KHALIL e ABDALLA, 1999).

Recentemente, foram patenteados, nos Estados Unidos, um glicosídeo (denominado ambaí) e um alcalóide (denominado cecropina). Estes foram identificados como compostos ativos presentes em plantas do gênero *Cecropia*, responsáveis pelas suas propriedades cardiotônica e diurética (CONSOLINI *et al.*, 2006).

### 1.2.5 *Cecropia pachystachya* Trécul

*Cecropia pachystachya*, cuja sinonímia é *Cecropia adenopus*, pertence à família Moraceae (Cecropiaceae). É conhecida popularmente como umbaúba, imbaúba, embaúva, umbaúba-do-brejo, árvore-da-preguiça, umbaubeira, pau-de-lixia, umbaúba branca, árvore-da-preguiça, torém, preguiceira. Seu nome indígena, Aguai, vem do tupi-guarani, e significa “fruta da árvore de tronco oco” (HERNÁNDEZ-TERRONES *et al.*, 2007).

Trata-se de uma espécie nativa, pioneira, perenifólia, que ocorre desde o Rio Grande do Norte até Santa Catarina, tanto na área de influência dos cerrados, como nas florestas estacionais e formações do complexo atlântico. É característica de solos de maior umidade, típica da borda de matas, clareiras grandes e de estradas. Tem preferência pelos locais ensolarados, sendo rara sua presença no interior de matas fechadas. Floresce de setembro a outubro e frutifica de maio a junho. O desenvolvimento das plantas no campo é rápido. Os frutos são procurados pelas aves e servem de alimento a várias espécies de peixes, como pacu, piracanjuba e outros. É chamada de árvore-da-preguiça por ter nas folhas jovens um dos seus alimentos preferidos (LORENZI e MATOS, 2002).

Caracteriza-se por ser uma árvore de 4 a 7 m de altura, com tronco de casca cinzenta com manchas brancas, e copa com forma de taça com galhos bem distribuídos. As folhas são digitadas com 7 a 10 lobos (recortes) sob pecíolo (haste ou suporte) longo. A lâmina foliar é áspera e tomentosas (coberta de lanugem), sendo que a face inferior é brancacenta. A inflorescência é axilar (no encontro da junção da folha com o ramo) e espiciforme (em forma de espiga) com inúmeras flores minúsculas e unissexuais. Espécie dióica com inflorescências masculinas ramificadas, com segmentos organizados aos pares, mais ou menos pêndulas; as femininas, também aos pares, pêndulas na frutificação, com bráctea pilosa (LORENZI e MATOS, 2002).

A Fotografia 1 mostra o aspecto das folhas e da árvore de *Cecropia pachystachya*.



**Fotografia 1:** *Cecropia pachystachya*. Fonte: <http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/am26.htm>

*Cecropia pachystachya* é uma árvore de crescimento rápido que resiste a baixas temperaturas, de no máximo 0 grau, vegeta bem em qualquer altitude. O solo pode ser profundo, úmido, ácido ou neutro, com constituição arenosa ou argilosa (solo vermelho) e até pedregoso. A árvore pode ser usada em reflorestamento como pioneira por ter crescimento rápido, resistir à seca e produzir alimento para os pássaros (LORENZI e MATOS, 2002).

Os frutos, representados na Fotografia 2, são finos, alongados e, quando estão maduros, a polpa fica estufada e macia. Eles têm gosto de doce de figo e podem ser consumidos in-natura, mastigando e espremendo na boca, restando apenas um bagacinho fibroso com as sementes que devem ser cuspidas. Atrai grande numero de pássaros e a árvore é também ornamental (LORENZI e MATOS, 2002).



**Fotografia 2:** Frutos de *C. pachystachya*. Fonte: <http://frutasraras.sites.uol.com.br/cecropiapach.htm>

## 2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos observou-se um significativo aumento na utilização dos fitoterápicos na medicina popular, destacando-se o uso para o tratamento de doenças crônicas, especialmente o diabetes melito. Diante dessa realidade, pesquisas multidisciplinares devem ser intensificadas visando comprovar a ação terapêutica de princípios ativos de origem vegetal, garantindo a segurança e eficácia na sua aplicação por parte dos profissionais de saúde.

Durante a investigação etnofarmacológica, muitas espécies foram investigadas, destacando-se a espécie *Cecropia pachystachya*, para a qual não foram encontrados estudos que comprovassem sua atividade hipoglicemiante.

Diante dos fatos, foi desenvolvido esse estudo a fim de se avaliar o efeito hipoglicemiante do extrato metanólico de *C. pachystachya* em ratos normais e diabéticos. Dentre os estudos necessários para que essa espécie possa ser efetivamente utilizada no controle do diabetes, está a avaliação do seu potencial toxicológico, além de seu perfil fitoquímico e atividade antioxidante.

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial farmacológico e químico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade hipoglicemiante aguda, sub-crônica e crônica do extrato metanólico de *C. pachystachya* em ratos normais e diabéticos induzidos com aloxano.
- Dosar os níveis de bilirrubina e enzimas que refletem as funções hepática (fosfatase alcalina, ALT, AST), pancreática (amilase e lipase) e renal (ureia, creatinina).
- Dosar marcadores dos metabolismos lipídico (colesterol total e frações, triglicérides) e protéico (proteínas totais e frações).
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato metanólico de *C. pachystachya* através do ensaio de *Artemia salina*.
- Identificar as classes de constituintes químicos do extrato metanólico de *C. pachystachya*.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro*, através dos ensaios de DPPH e poder de redução, do extrato metanólico de *C. pachystachya*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Cecropia pachystachya* foram coletadas em novembro de 2004. A planta foi identificada pelo Dr. Ricardo Montanele de Castro da Universidade de Feira de Santana, BA, Brazil. A exsicata (CESJ 46591) está depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

### PREPARO DO EXTRATO

As folhas de *Cecropia pachystachya* foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C e pulverizadas, a fim de obter o material vegetal seco (60g). Este foi extraído por maceração com metanol, à temperatura ambiente, por 48, 24 e 24 horas. O extrato foi concentrado à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório (Heidolph– Laborota 4000®).

## 4.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

### 4.1.1 Análise fitoquímica

O extrato metanólico foi submetido às análises fitoquímicas preliminares para determinação das principais classes químicas de metabólitos especiais, de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações.

#### Preparo das amostras para análise dos metabólitos especiais

Aproximadamente 100 mg de extrato metanólico foram solubilizados em metanol e utilizados para identificação de alcalóides, triterpenóides, esteróides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, antraquinonas, antocianidinas, chalconas, leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

#### ***Alcalóides***

Em uma placa de Elisa, 150 µl da amostra foram colocados em três poços diferentes e 50 µl de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcalóides (Reativos de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada poço. O aparecimento de precipitado ou turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcalóides.

### ***Triterpenóides e Esteróides***

Em uma placa de Elisa, 150 µl da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram acrescentados 1 gota de anidrido acético e 1 a 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada é indicativo da presença de esteróides e de cor vermelha, da presença de triterpenóides.

### ***Saponinas***

Em um tubo de ensaio foram colocados 1 ml da amostra e aproximadamente 2 ml de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos e colocado em repouso por 20 minutos. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indica a presença de saponinas.

### ***Cumarinas***

A amostra foi gotejada em um pedaço de papel de filtro. Em seguida, 1 gota da solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. O aparecimento de fluorescência de cor azulada sob luz UV 365nm indica a presença de cumarinas.

### ***Compostos fenólicos***

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de  $\text{FeCl}_3$  2%. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

### ***Taninos***

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml da amostra e gota a gota, foi acrescentada uma solução de gelatina 2,5%. O aparecimento de precipitado branco indica a presença de taninos.

### ***Flavonóides***

Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de  $\text{AlCl}_3$  5%. O aparecimento de fluorescência de cor amarela sob luz UV 365 nm indica a presença de flavonóides.

### ***Antraquinonas***

Em uma placa de Elisa, 150  $\mu\text{l}$  da amostra foram colocados em um poço. Em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,5M. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de antraquinonas.

### ***Antocianidinas e Chalconas***

Em três tubos de ensaio foi adicionado 1 ml da amostra. O tubo 1 foi acidificado com HCl 0,5M (pH 3). Os tubos 2 e 3 foram alcalinizados com NaOH 0,5M (pH 8 e 11, respectivamente). O aparecimento de coloração vermelha, lilás e azul-púrpura nos tubos 1, 2 e 3, respectivamente, indica a presença de antocianidinas. Coloração vermelha nos tubos 1 e 3 é indicativo de chalconas.

### ***Leucoantocianidinas e Catequinas***

Em um tubo de ensaio 1 ml da amostra foi acidificado com HCl 0,5M (pH 3). Em seguida, o tubo foi aquecido, em bico de Bunsen, cuidadosamente. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de leucoantocianidinas e amarela de catequinas.

### ***Flavononas***

Em um poço da placa de Elisa foram adicionados 150µl da amostra e alguns pedaços de magnésio metálico. Em seguida, acrescentou-se 1 gota de HCl concentrado. O aparecimento de coloração vermelha indica presença de flavononas.

#### 4.1.2 Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais em extratos vegetais foi determinado pelo método de Folin-Denis (DUH e YEN, 1997). Para a preparação da curva de calibração foram misturados 0,07; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50 ml de solução de ácido tânico (1 g/l) com qsp 1 ml etanol P.A. Em seguida, para cada solução, 1 ml do reagente de Folin-Denis e 8 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% em tampão NaOH 0,1N foram misturados e agitado. A absorbância foi mensurada, depois de 60 minutos em banho a 30°C, a 730 nm e a curva de calibração foi construída. Um ml do extrato da planta (0,5 mg/ml) foi misturado com os mesmos reagentes como descrito acima. O branco foi preparado com 1 ml de metanol, 8 ml de tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  em NaOH 0,1N e 1 ml do reagente de Folin-Denis. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicata. O conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em mg/g extrato vegetal, em equivalente de ácido tânico (EAT).

#### 4.1.3 Determinação do conteúdo de flavonóides

O conteúdo de flavonóides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas, Venskutonis e Van-Beer (2004), com pequenas modificações, usando a rutina como composto de referência com pequenas modificações. A curva de calibração da rutina foi preparada por mistura de 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,10 ml de uma solução etanólica de rutina (0,5 mg/ml) com 1 ml de cloreto de alumínio em etanol (20 g/l) e diluída com etanol para 25ml. A absorvância foi mensurada a 415nm, depois de 40 minutos a 20°C e a curva de calibração foi construída. Um ml do extrato vegetal em metanol (0,5 mg/ml) foi misturado com os mesmos reagentes como descrito acima. Branco foi preparado com 1ml do extrato vegetal e 1 gota de ácido acético e diluído para 25ml. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicata. O conteúdo total de flavonóides foi expresso em mg/g extrato vegetal, em equivalente de rutina (RE).

#### 4.1.4 Determinação do perfil cromatográfico por clae

Para determinar os perfis cromatográficos das amostras de *Cecropia pachystachya* e ácido clorogênico foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Agilent Technologies 1200 Series, com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático. Para separação das substâncias empregou-se coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm) e um gradiente linear dos solventes A (acetonitrila: água, 5:95, v/v, pH 4,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (acetonitrila: água, 90:10, v/v, pH 4,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) variando de 0% - 100% B em 30 min; o fluxo foi 1 ml/min. Após 44 min, o programa de eluição retornou à condição inicial; o volume de injeção foi de 10µl, na concentração de 1 mg/ml para o ácido clorogênico e 2mg/ml para *C. pachystachya* e a temperatura mantida a 25° C durante a análise. A detecção foi feita em 230 nm.

## 4.2 ESTUDO BIOLÓGICO

### 4.2.1 Atividade citotóxica contra *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”)

A presença de constituintes citotóxicos foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Meyer et al. (1982) e modificada por Afonso-Neto (2003). Larvas de *Artemia salina* (náuplios), obtidas a partir de ovos utilizados como ração para peixes ornamentais (TROPFISH®), foram colocadas para eclodir em aquário com água do mar artificial arejada durante 48 horas. O extrato foi solubilizado em água do mar artificial, com o auxílio de DMSO 1%. O teste foi realizado em tubo de ensaio com 10 náuplios, preenchido com 4,5 ml de água do mar artificial e 0,5 ml do extrato vegetal. A amostra foi testada nas concentrações de 1000, 100 e 10 µg/ml. Após 24 horas foram contados os indivíduos vivos nas diferentes concentrações. Timol (Vetec) e a água do mar artificial + DMSO 1% foram usados com controles positivo e negativo, respectivamente. O teste foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em CL<sub>50</sub> (concentração necessária para matar 50% dos náuplios) que foi calculado pelo programa estatístico Probit (FINNEY, 1971).

#### 4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres – método do DPPH

O método de Brand-Williams (GOVINDARAJAN *et al.*, 2003) tem por base a redução do radical 2,2'-difênil-1-picrihidrazilo (DPPH), o qual apresenta um máximo de absorção a 517nm. Ao fixar um H<sup>+</sup>, abstraído ao antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorvância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH.

Soluções nas concentrações de 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,92; 1,95 e 0,90 µg/ml foram preparadas utilizando-se a amostra e solução de DPPH. Após um período de 30 minutos, foi feita a leitura da absorvância da amostra e do branco (MeOH + DPPH) num espectrofotômetro a 517nm. De posse destes valores foi calculada a porcentagem (%) de inibição da amostra da seguinte forma:

$$\% \text{ de inibição da amostra} = \frac{\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do branco}} \times 100$$

Absorbância do branco

Foi calculado o IC<sub>50</sub>, que é a concentração da amostra necessária para reduzir a 50% a concentração inicial do DPPH (CHEVOLLEAU *et al.*, 1992. Desta forma, quanto menor o valor de IC<sub>50</sub>, maior a atividade antioxidante do composto. Rutina e quercetina foram utilizados como controle positivo.

#### 4.2.3 Determinação do poder de redução

O poder de redução da amostra foi determinado pelo método descrito por Oyazu (1986). Quatro miligramas da amostra foram diluídos em 4 ml de água e adicionados 2,5 ml de tampão fosfato de potássio 200  $\mu$ M (pH 6,6) e 2,5 ml de ferricianeto de potássio 1 % [ $K_3Fe(CN)_6$ ]. A mistura foi incubada a 50 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 ml de ácido tricloroacético 10% foi adicionada à mistura, centrifugada a 3000 giros por min. Uma alíquota de 2,5 ml do sobrenadante foi retirada e misturada com 2,5 ml de água destilada e 0,5 ml de  $FeCl_3$  0,1% e a absorbância foi mensurada a 700 nm. Utiliza-se o ácido ascórbico L(+) como padrão de referência.

Todos os testes foram realizados em triplicata e o gráfico construído com a média de três concentrações. Os dados apresentados em comparação com o controle (ácido ascórbico L(+)) foram reportados como a média  $\pm$  desvio padrão de cinco concentrações diferentes (53,64  $\mu$ g/ml, 26,82  $\mu$ g/ml, 13,41  $\mu$ g/ml, 6,7  $\mu$ g/ml e 3,35  $\mu$ g/ml).

### 4.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO

#### 4.3.1 Atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de *C. pachystachya* em ratos normais e diabéticos

##### Preparo das soluções para administração oral

A dosagem do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* administrada aos animais foi determinada previamente por um teste oral de tolerância à glicose. Neste teste foram avaliadas 6 dosagens diferentes do extrato (10, 20, 40, 80, 100 e 120 mg/kg/ml). O efeito hipoglicemiante mais pronunciado foi observado nos animais que receberam 80mg/kg/ml de extrato (dados não mostrados). A partir desses dados, essa dosagem foi utilizada para avaliação do efeito hipoglicemiante desse extrato.

O extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*, os controles positivos glibenclamida e metformina foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,9%) com DMSO 3% resultando em uma solução do extrato na dose de 80mg/kg/ml, glibenclamida a 3mg/kg/ml (ANDRADE-CETTO e WIEDENFELD, 2001) e metformina a 120mg/kg/ml (ANDRADE *et al.*, 2007).

Os animais pertencentes ao grupo controle negativo receberam apenas o veículo (DMSO 3% em solução salina).

## Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 60 dias, pesando entre 160 e 200 g, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C e umidade 45 – 55%, fotoperíodo de 12/12 horas e livre acesso à água e à ração comercial (Nuvital™, Colombo, PR, BR).

## Indução de diabetes melito

Diabetes melito foi induzido por uma injeção intravenosa de 80 mg/kg/ml de aloxano monohidratado dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%). Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas. Após sete dias da administração do aloxano, a glicemia de jejum foi determinada. Animais que apresentaram glicemia acima de 200mg/dl foram considerados diabéticos e selecionados para esse estudo.

Para todos os ensaios de medida de glicemia foi utilizado o glucômetro Accu-Check Advantage - Roche.

## Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos, de 6 animais cada, de acordo com a indução e o tipo de tratamento administrado:

Grupo DCN – Animais diabéticos que recebem apenas o veículo (DMSO 3% em NaCl 0,9%); corresponde ao grupo diabético controle negativo;

Grupo DE – Animais diabéticos que recebem a solução de extrato de *C. pachystachya*, na concentração de 80mg/kg/ml; corresponde ao grupo diabético extrato;

Grupo DG - Animais diabéticos que recebem solução de glibenclamida (Embrafarma<sup>®</sup>, lote 6135) na concentração de 3mg/kg/ml; corresponde ao grupo diabético glibenclamida, grupo controle positivo;

Grupo DM - Animais diabéticos que recebem solução de metformina (Galena<sup>®</sup>, lote Met 26070030) na concentração de 120mg/kg/ml; corresponde grupo diabético metformina, grupo controle positivo;.

Grupo NCN – Animais não diabéticos que recebem apenas o veículo (DMSO 3% em NaCl 0,9%); corresponde ao grupo não diabético controle negativo;

Grupo NE – Animais não diabéticos que recebem a solução de extrato de *C. pachystachya*, na concentração de 80mg/Kg/ml; corresponde ao grupo não diabético extrato.

## **Efeito hipoglicemiante agudo**

### **A – Curva glicêmica**

Após confirmação da glicemia de jejum, foi administrado, via oral, 1ml de solução de extrato, veículo ou controles positivos. Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal 0,5; 1; 1,5 e 2 horas após essa administração para medida da glicemia e construção da curva glicêmica.

### **B – Teste oral de tolerância à glicose**

Após confirmação da glicemia de jejum, foi administrado, via oral, 1ml de solução de glicose 2mg/kg/ml. Trinta minutos depois, foi realizada uma nova medida de glicemia (tempo 0) e imediatamente administrado, via oral, 1ml de solução de extrato, veículo ou controles positivos. Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas após administração de extrato, veículo ou controles positivos, para medida da glicemia e construção da curva glicêmica.

### **Efeito hipoglicemiante sub-crônico**

Após confirmação da glicemia de jejum, os animais receberam, via oral, 1ml de solução de extrato, veículo ou controles positivos, diariamente (às 8:00 horas), sem serem submetidos a um jejum prévio. Ao final de 7 dias, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal para medida da glicemia de jejum. Logo depois, foi administrado novamente, via oral, 1ml da solução de extrato, veículo ou controles positivos. Novas medidas de glicemias foram realizadas 0,5; 1; 1,5; 2; 4 e 6 horas após administração de extrato, veículo ou controles positivos, para medida da glicemia e construção da curva glicêmica.

### **Efeito hipoglicemiante crônico**

Aqueles mesmos animais submetidos ao teste sub-crônico tiveram seu tratamento prolongado por mais 36 dias, perfazendo um total de 42 dias. Esses animais receberam, via oral, 1ml de solução de extrato, veículo ou controles positivos, diariamente (às 8:00 horas), sem serem submetidos a um jejum prévio à administração dessas soluções. Em intervalos semanais, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal para medida da glicemia de jejum.

#### 4.3.2 Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* e avaliação do seu potencial toxicológico em ratos normais e diabéticos

Durante os 42 dias de tratamento, foram monitorados a massa corporal e os consumos de água e ração de cada animal.

Ao final dos 42 dias, os animais foram sacrificados. Esses animais estavam em jejum e não receberam nenhum tipo de tratamento com as soluções de extrato, veículo ou controles positivos no dia do sacrifício. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca para avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. As amostras foram armazenadas em freezer até o momento da análise, com exceção daqueles tubos contendo sangue total (coletado com anticoagulante EDTA), onde foi realizada a análise hematológica imediatamente após coleta. A dosagem dos parâmetros bioquímicos foi realizada através de kits comerciais (BIOCLIN<sup>®</sup> e LABTEST<sup>®</sup>).

A avaliação do potencial toxicológico foi baseada no “Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos” publicado na RDC 90 de 16 de março, da ANVISA (ANVISA, 2009). Essa avaliação envolveu a análise de parâmetros bioquímicos, incluindo provas de funções hepática (dosagens de ALT e AST e bilirrubinas total, direta e indireta), renal (dosagens de ureia e creatinina) e pancreática (dosagem de amilase), avaliação de dano celular (dosagem de fosfatase alcalina) e dos perfis lipídico (dosagem de triglicérides, colesterol total e frações) e protéico (dosagem de proteínas totais, albumina e globulina); além dos parâmetros hematológicos (dosagens de hemoglobina, hematimetria, hematócrito, índices hematimétricos e leucometrias global e específica).

Após coleta de sangue por punção cardíaca, os animais foram dissecados para retirada dos rins esquerdo e direito, e fígado. Esses órgãos foram armazenados em solução de formol 10% e para posterior análise histológica.

## Preparo e análise de lâminas histológicas

Os rins direito e esquerdo, e fígado foram coletados com o auxílio de um bisturi e pinça, e clivados para reduzir sua espessura, permitindo a penetração fácil do fixador. Os órgãos foram então imediatamente fixados em solução de formol 10%, em um volume 20 vezes maior desse fixador em relação aos tecidos fixados.

Após a preservação do tecido, a etapa seguinte consistiu em prepará-lo para o exame microscópico. A esse processo dá-se o nome de inclusão, que consiste na impregnação do tecido com uma substância de consistência firme que permita posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas. Pelo fácil manuseio e bons resultados, a parafina é a mais utilizada neste procedimento. Como ela não é miscível em água, a primeira etapa da inclusão compreende a desidratação, quando ocorre a retirada da água dos tecidos e a substituição por álcool (TIMM, 2005). Nessa etapa, o bloco de tecido foi colocado em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e 100%), em um volume 20 vezes maior que o volume da peça.

Antes de ser impregnado com parafina, removeu-se completamente a água e o álcool do bloco de tecido empregando-se xilol (chamado de agente clarificador) em um volume 20 vezes maior que o volume da peça.

Por fim, o bloco de tecido foi passado em duas trocas de parafina, a fim de se assegurar a substituição de todo o agente clarificador por parafina. Para essa etapa de impregnação utilizou-se parafina fundida (temperatura entre 56 e 60°C). O bloco de tecido permaneceu imerso na parafina fundida, em estufa a 50°C, durante o tempo necessário para completa impregnação. Posteriormente, o bloco foi retirado da estufa, deixado à temperatura ambiente até que a parafina endurecesse, sendo então retirado da forma e cortado em micrótomo. Os cortes mediam entre 4 e 6 micrômetros.

As fitas de cortes de parafinas foram estiradas cuidadosamente e os cortes individuais separados por um bisturi. Na superfície de uma lâmina de vidro foi feito um ponto de aderência revestindo-a com uma fina camada de albumina. O corte de parafina foi então colocado em banho-maria de forma que as dobras provocadas pelo corte do tecido desaparecessem. Após, o corte foi pescado com a lâmina revestida com albumina, aderindo à sua superfície.

Para se proceder à coloração das lâminas, o material foi submetido à retirada da parafina e hidratação da peça, a partir de uma sequência de banhos em xilol, álcool e água. Inicialmente, a peça foi submetida a um primeiro banho de xilol, com duração de 5 minutos, seguidos de um segundo e terceiro banhos de xilol (durando respectivamente 2 e 1 minutos). Posteriormente, a peça foi colocada em concentrações decrescentes de álcool (100%, 95% e 70%), em banhos com duração de 1 minuto cada. Por fim, a peça foi colocada em banho de água por 2 minutos.

Após hidratação os cortes foram corados segundo a técnica da Hematoxilina-Eosina (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). Nessa técnica, as lâminas foram inicialmente cobertas com Solução de Hematoxilina de Harris (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983) por 15 minutos, sendo posteriormente lavadas em água corrente por 10 minutos, e coradas com Solução de Eosina 1% (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983) por 10 minutos. Essas lâminas foram então lavadas em água corrente e desidratadas em álcool 70% rapidamente.

Antes de ser montada, a lâmina foi banhada em xilol, e uma gota do meio de montagem, o Bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983), foi colocada sobre o corte. A lamínula foi então posicionada sobre o corte de forma delicada até que o meio de montagem cobrisse completamente o corte. Após estabilização desse meio de montagem, lâmina e lamínula estavam firmemente aderidas uma à outra.

As lâminas foram analisadas em microscópio eletrônico utilizando-se aumentos de 25 e 40 vezes (para análise mais detalhada de possíveis alterações no interior das células). Todos os campos da lâmina foram avaliados.

#### 4.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos *in vitro* e *in vivo* foi realizada pelo teste de ANOVA de uma via seguida de teste de Tukey para os parâmetros bioquímicos e hemograma. E para comparação de curvas glicêmicas e evoluções de glicemias semanais, massas corporais e consumos de água e ração, foi utilizado o teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

#### 5.1.1 Análise fitoquímica

Para avaliação do perfil fitoquímico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* foram realizados ensaios qualitativos (marcha fitoquímica, CLAE) e quantitativos (doseamento de fenóis totais e flavonóides).

Os resultados da marcha fitoquímica revelaram a presença de compostos fenólicos, como flavonóides, taninos e antocianidinas; além de esteróides e alcalóides, conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Estudo fitoquímico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. + indica presença do fitoconstituente; - indica ausência do fitoconstituente.

<b>FITOCONSTITUENTES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>Fenóis totais</b>	+
Flavonóides	+
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	-
Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas	+
Taninos	+
Flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas	+
<b>Cumarinas</b>	+
<b>Saponinas</b>	-
<b>Esteróides</b>	+
<b>Triterpenóides</b>	-
<b>Antraquinonas</b>	+
<b>Alcalóides</b>	+

#### 5.1.2 Determinação do conteúdo de fenóis totais

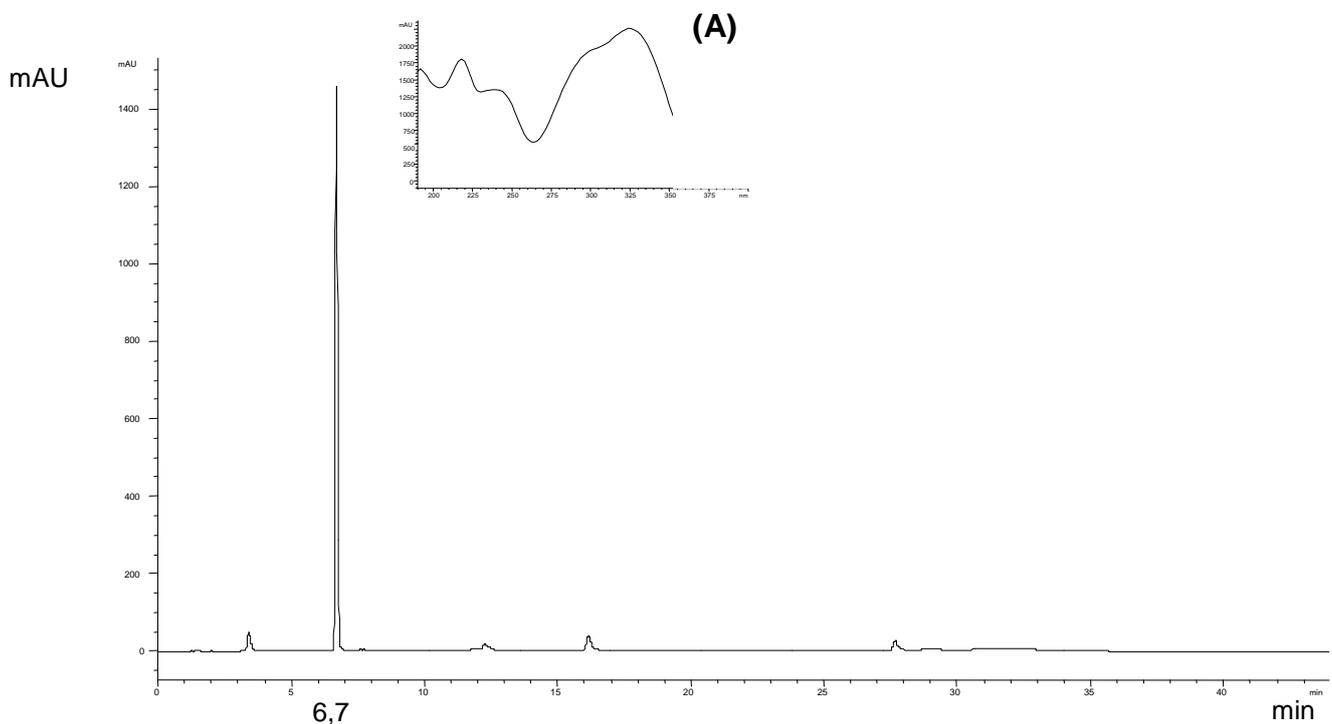
No doseamento de fenóis totais, o extrato apresentou  $326 \pm 0,06$  mg de fenóis/g de extrato equivalentes ao ácido tânico.

### 5.1.2 Determinação do conteúdo de flavonóides

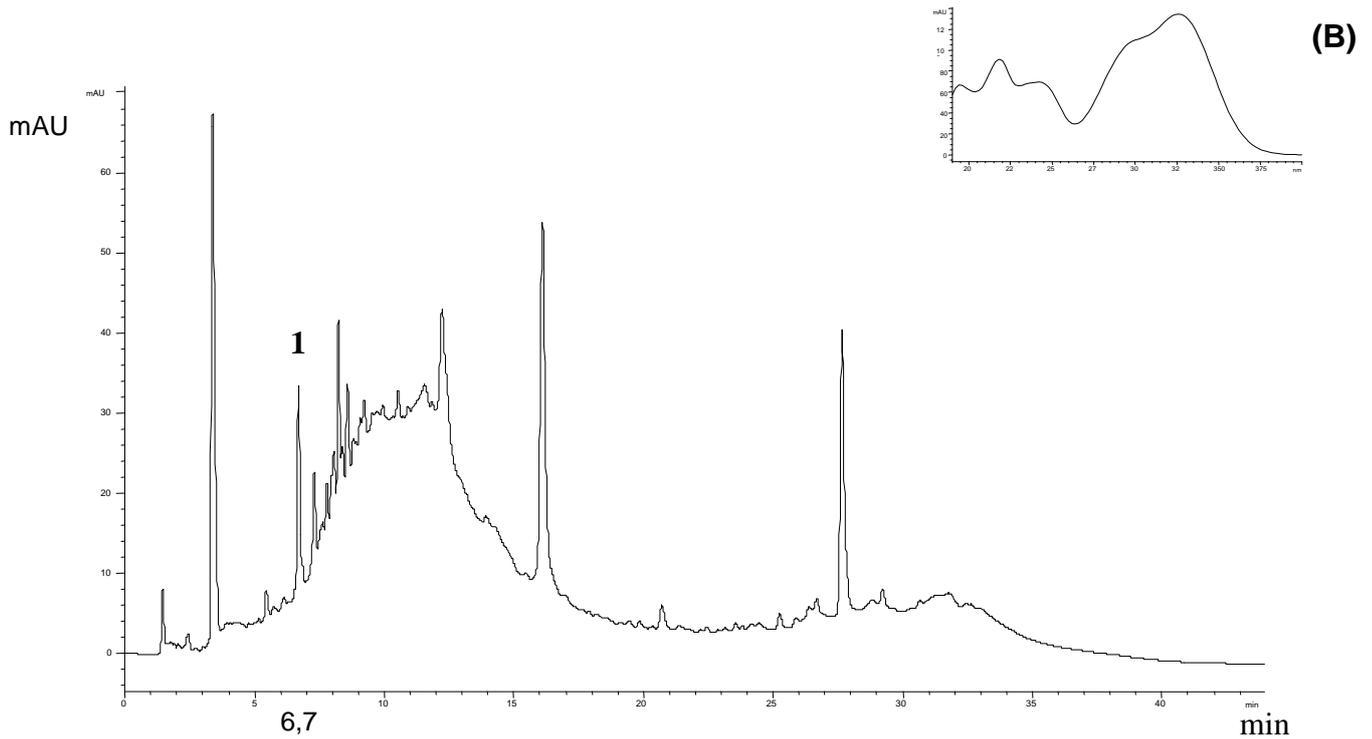
Na quantificação do teor de flavonóides foram encontrados  $82,5 \pm 0,23$  mg de flavonóides/g de extrato equivalentes à rutina.

### 5.1.3 Determinação do perfil cromatográfico por CLAE

Os gráficos 1 e 2 apresentam o perfil cromatográfico do ácido clorogênico e do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*, respectivamente.



**Gráfico 1:** Perfil cromatográfico por CLAE do ácido clorogênico  $\lambda$  230 nm. **(A)** espectro UV do ácido clorogênico



**Gráfico 2:** Perfil cromatográfico por CLAE do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*.  $\lambda = 230$  nm; **(B)** representa o espectro no ultravioleta do ácido clorogênico do pico **1** identificado como ácido clorogênico.

## 5.2 ESTUDO BIOLÓGICO

### 5.2.1 Atividade citotóxica contra *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”)

O extrato de *C. pachystachya* não apresentou toxidez contra *Artemia salina* ( $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$ ), enquanto que o controle negativo timol apresentou um  $IC_{50}$  de 1,4 (0,7 – 3,0)  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.2.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres – método do DPPH

O extrato metanólico demonstrou um potencial antioxidante ( $IC_{50}$  3,1 (2,0 – 4,5)  $\mu\text{g/ml}$ ) estatisticamente igual a padrões de flavonóides puros, como rutina e quercetina ( $IC_{50}$  2,52 (2,1 – 3,0)  $\mu\text{g/ml}$  e  $IC_{50}$  0,98 (0,5 – 1,9)  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente).

### 5.2.3 Determinação do poder de redução

O extrato metanólico de *Cecropia pachystacha* apresentou um  $EC_{50}$  de 10,85  $\pm$  0,65  $\mu\text{g/ml}$ , estatisticamente diferente do valor encontrado para o ácido ascórbico (1,80  $\pm$  0,48  $\mu\text{g/ml}$ ).

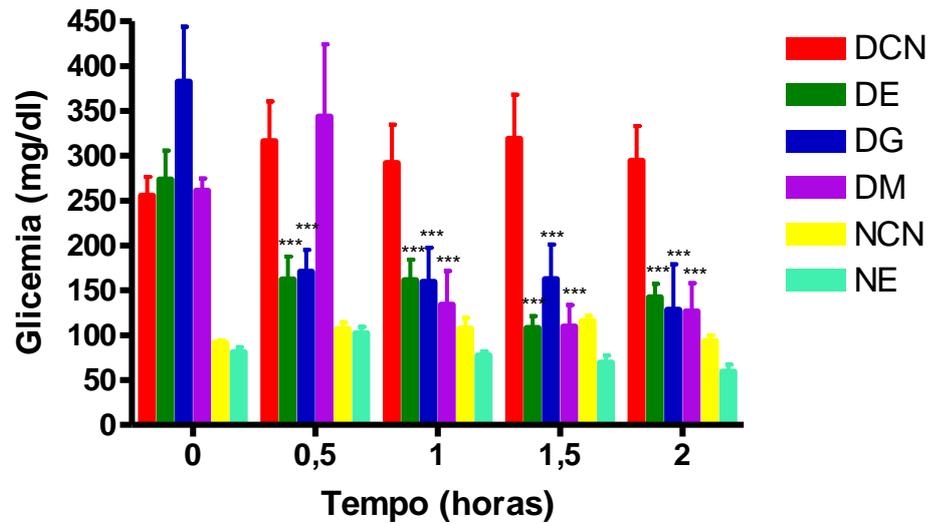
### 5.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO

#### 5.3.1 Efeito hipoglicemiante do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos

##### **Efeito hipoglicemiante agudo**

A – Curva glicêmica

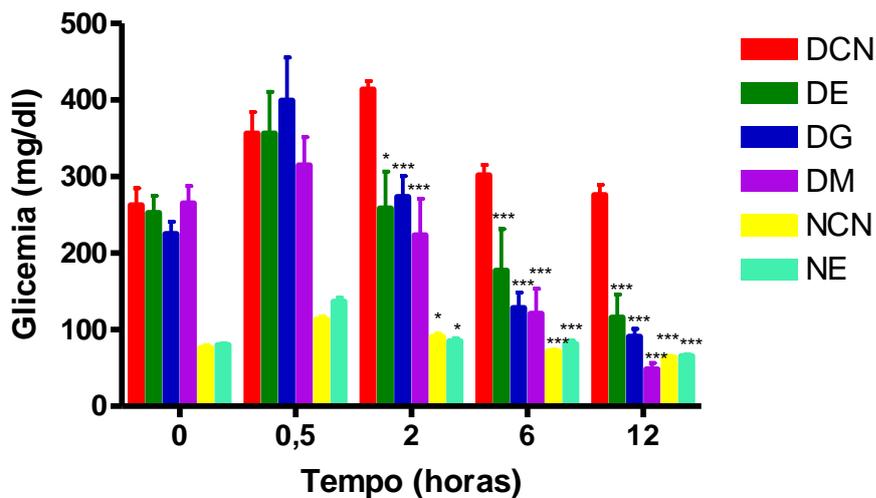
O efeito agudo do extrato metanólico de *C. pachystachya* em ratos normais e diabéticos é mostrado no Gráfico 3.



**Gráfico 3:** Efeito hipoglicemiante agudo do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos Curva glicêmica. O tempo 0 corresponde à medida da glicemia de jejum. E os tempos 30, 60, 90 e 120 min, correspondem às glicemias após administração, via oral, do veículo, extrato ou controles positivos. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \*\*\* Redução significativa ( $p < 0,001$ ) da glicemia em relação à glicemia de jejum (no tempo 0) do mesmo grupo.

## B – Teste oral de tolerância à glicose

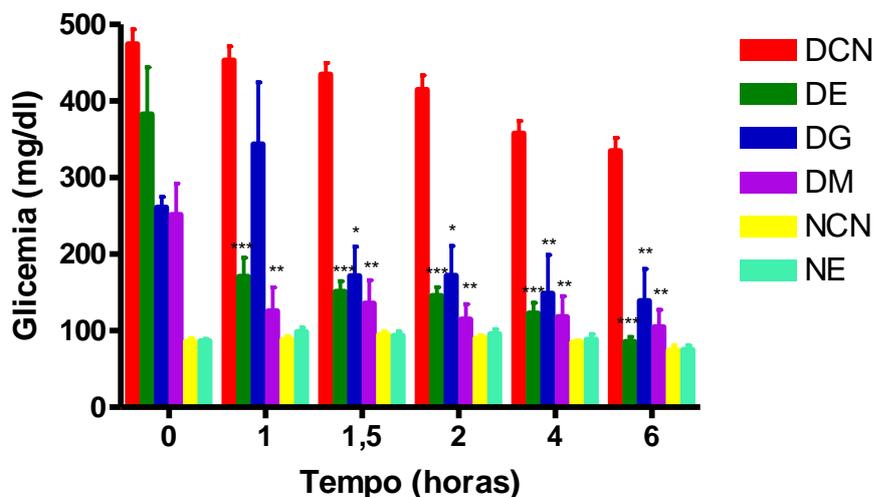
O Gráfico 4 mostra as glicemias dos grupos experimentais nos tempos 0; 0,5; 2; 6 e 12 horas no TOTG.



**Gráfico 4:** Efeito hipoglicemiante agudo do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O tempo 0 corresponde à medida da glicemia de jejum. O tempo 0,5 corresponde à glicemia medida 30 minutos após administração da solução de glicose. E os tempos 2, 6 e 12 horas, correspondem às glicemias após administração, via oral, do veículo, extrato ou controles positivos. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Redução significativa da glicemia ( $p < 0,05$ ) em relação à glicemia do tempo 0,5 do mesmo grupo; \*\*\* Redução significativa da glicemia ( $p < 0,001$ ) em relação à glicemia do tempo 0,5 do mesmo grupo.

## Efeito hipoglicemiante sub-crônico

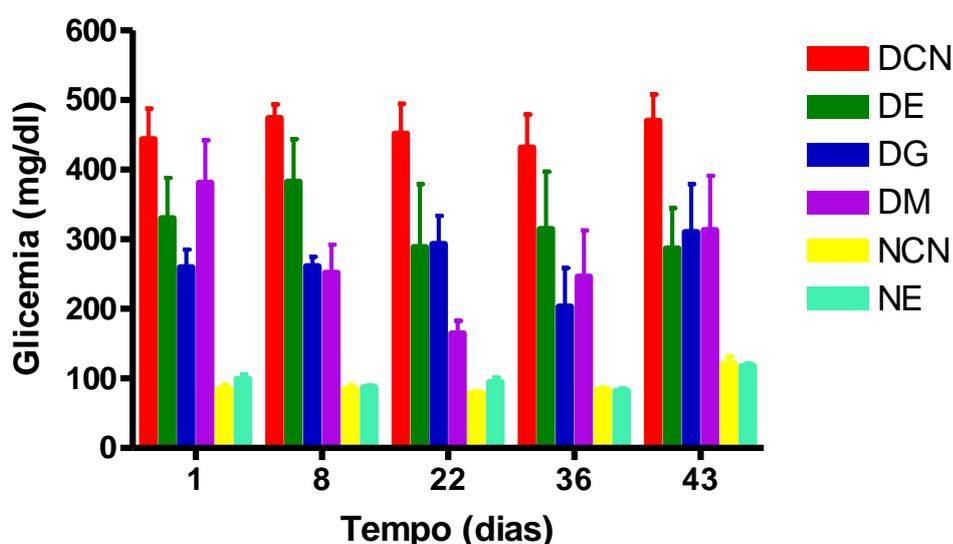
O Gráfico 5 representa as glicemias dos grupos experimentais, nos tempos 0, 1, 1,5, 2, 4 e 6 horas.



**Gráfico 5:** Efeito hipoglicemiante sub-crônico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos. O tempo 0 corresponde à medida da glicemia de jejum após 7 dias de tratamento diário. E os tempos 1, 1,5, 2, 4 e 6 horas, correspondem às glicemias após administração, via oral, do veículo, extrato ou controles positivos. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Redução significativa da glicemia ( $p < 0,05$ ) em relação à glicemia de jejum (tempo 0) do mesmo grupo; \*\* Redução significativa da glicemia ( $p < 0,01$ ) em relação à glicemia de jejum (tempo 0) do mesmo grupo; \*\*\* Redução significativa da glicemia ( $p < 0,001$ ) em relação à glicemia de jejum (tempo 0) do mesmo grupo.

## Efeito hipoglicemiante crônico

O Gráfico 6 apresenta as glicemias do primeiro, oitavo, vigésimo segundo, trigésimo sexto dias, e após o último dia de tratamento, que corresponde ao quadragésimo terceiro dia.

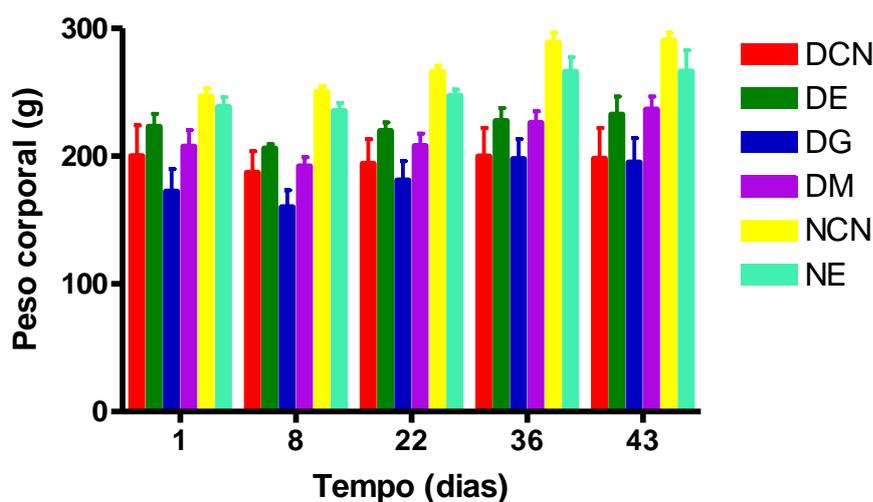


**Gráfico 6:** Efeito hipoglicemiante crônico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos. O tempo 1 corresponde à medida da glicemia de jejum no primeiro dia de tratamento. Os tempos 8, 22 e 36 correspondem às glicemias de jejum do oitavo, vigésimo segundo e trigésimo sexto dias de tratamento. E o tempo 43 corresponde à glicemia de jejum após o último dia de tratamento. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

### 5.3.2 Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos e avaliação do potencial toxicológico

#### Massa corporal

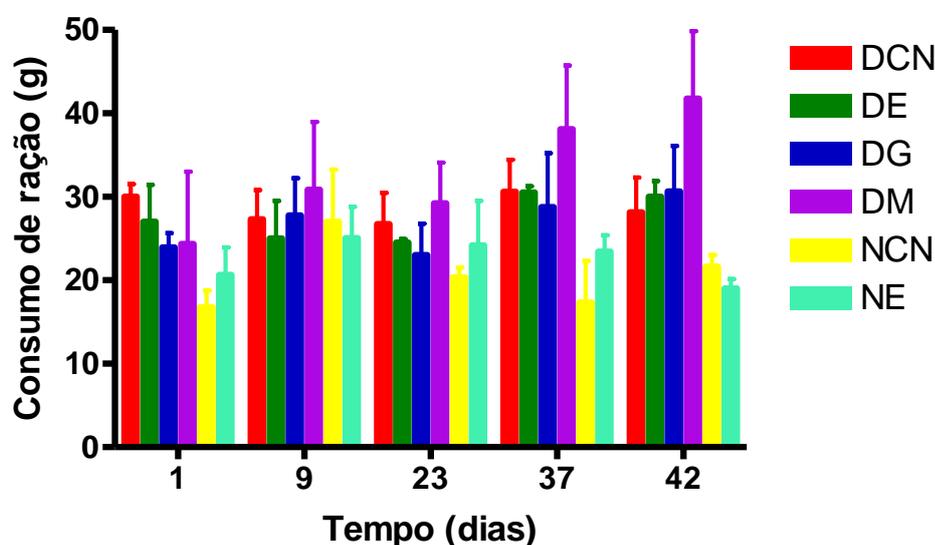
O Gráfico 7 mostra a massa corporal de cada grupo no primeiro dia de tratamento, e também no oitavo, vigésimo segundo e trigésimo sexto dias, e após o último dia de tratamento, correspondendo ao quadragésimo terceiro dia.



**Gráfico 7:** Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos diabéticos e não diabéticos. O tempo 1 corresponde à massa corporal no primeiro dia de tratamento. Os tempos 8, 22 e 36 correspondem às massas corporais do oitavo, vigésimo segundo e trigésimo sexto dias de tratamento, respectivamente. E o tempo 43 corresponde à massa corporal após o último dia de tratamento. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

## Consumo de ração

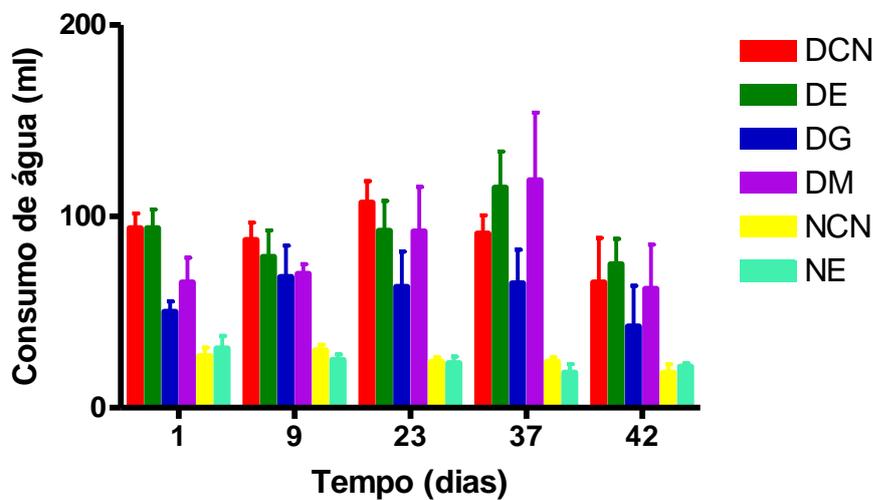
O Gráfico 8 apresenta as médias de consumo de ração de cada grupo no segundo, nono, vigésimo terceiro e trigésimo sétimo dias, e após o último dia de tratamento, correspondendo ao quadragésimo terceiro dia.



**Gráfico 8:** Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos diabéticos e não diabéticos. Os tempos 2, 8, 22 e 36 correspondem aos consumos de ração do segundo, nono, vigésimo terceiro e trigésimo sétimo dias de tratamento, respectivamente. E o tempo de 43 corresponde ao consumo de ração após o último dia de tratamento. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

## Consumo de água

O gráfico 9 apresenta as médias de consumo de água de cada grupo no segundo, nono, vigésimo terceiro e trigésimo sétimo dias, e após o último dia de tratamento, correspondendo ao quadragésimo terceiro dia.

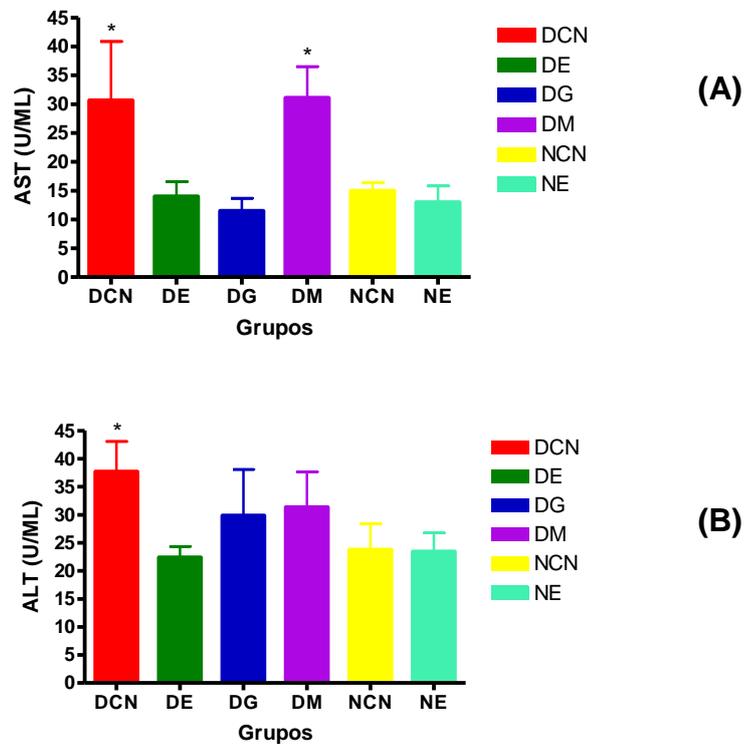


**Gráfico 9:** Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos diabéticos e não diabéticos. Os tempos 2, 8, 22 e 36 correspondem aos consumos de água do segundo, nono, vigésimo terceiro e trigésimo sétimo dias de tratamento, respectivamente. E o tempo 43 corresponde ao consumo de água após o último dia de tratamento. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

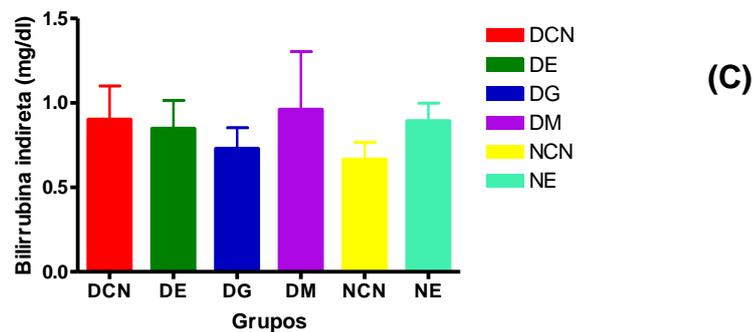
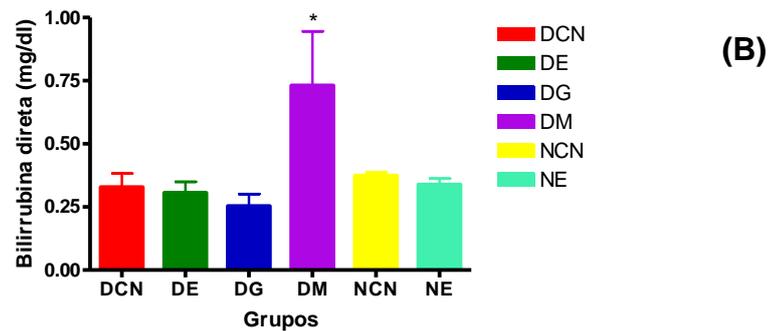
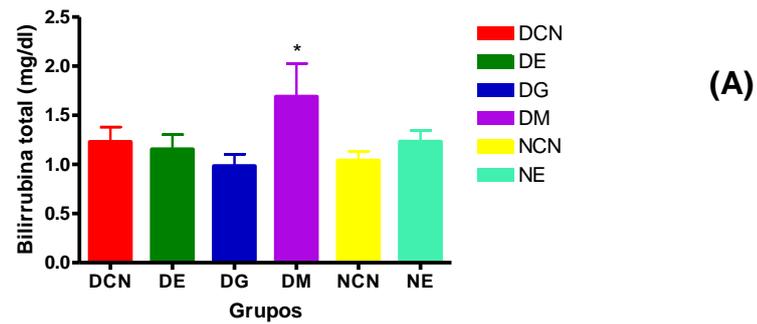
## Avaliação do potencial toxicológico

### Avaliação das funções hepática e biliar

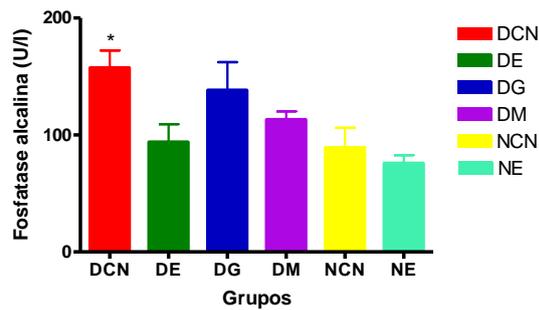
As provas de funções hepática e biliar envolveram dosagens das transaminases AST e ALT, bilirrubinas total, direta e indireta, e fosfatase alcalina. Os Gráficos 10, 11 e 12 mostram os níveis séricos desses parâmetros.



**Gráfico 10:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Provas de funções hepática e biliar, níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) **(A)** e alanina aminotransferase (ALT) **(B)**. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais normais.



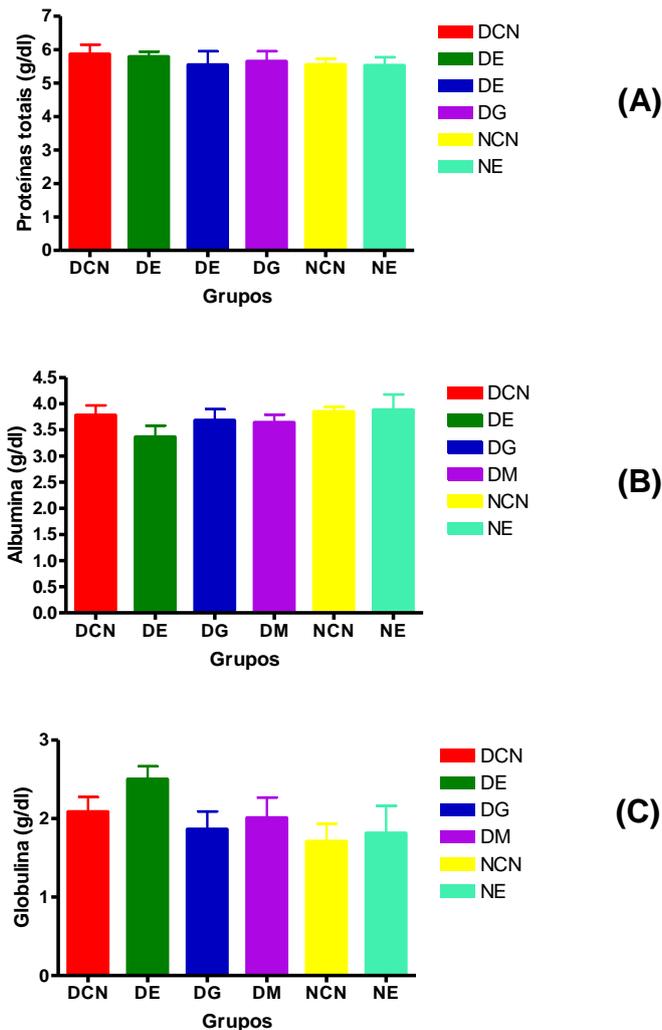
**Gráfico 11:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Provas de funções hepática e biliar, níveis séricos de bilirrubina total (A), bilirrubina direta (B) e bilirrubina indireta (C). DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais normais.



**Gráfico 12:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Provas de funções hepática e biliar, níveis séricos de fosfatase alcalina. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais normais.

## Avaliação do perfil protéico

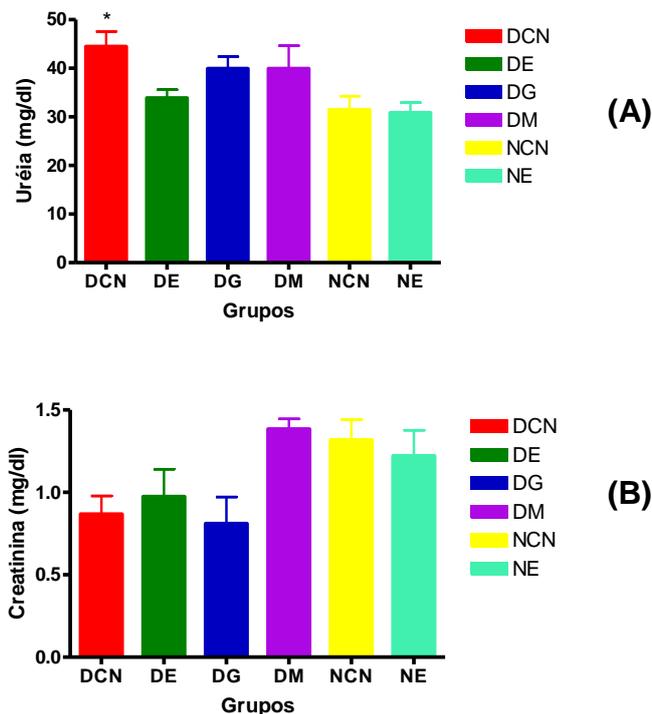
Para avaliação do perfil protéico foram dosados os níveis séricos de proteínas totais, albumina e globulina, conforme ilustrado no Gráfico 13.



**Gráfico 13:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Perfil protéico, níveis séricos de proteínas totais **(A)**, albumina **(B)** e globulina **(C)**. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

## Avaliação de função renal

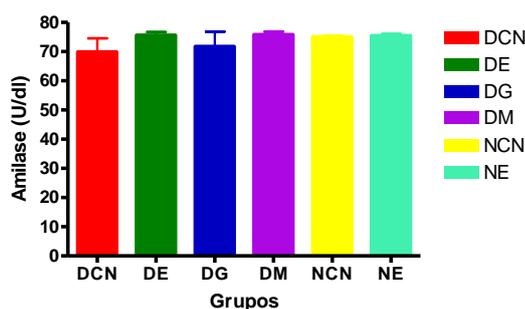
As provas de função renal envolveram as dosagens de ureia e creatinina plasmáticas, mostradas no Gráfico 14.



**Gráfico 14:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Provas de função renal, níveis plasmáticos de ureia **(A)** e creatinina **(B)**. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais normais.

## Avaliação de função pancreática

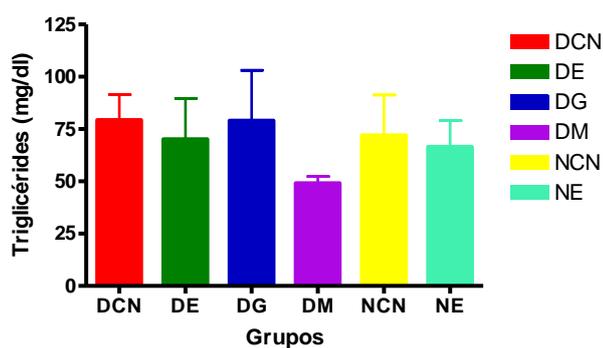
A função pancreática foi avaliada através da dosagem dos níveis séricos de amilase, conforme ilustrado no Gráfico 15.



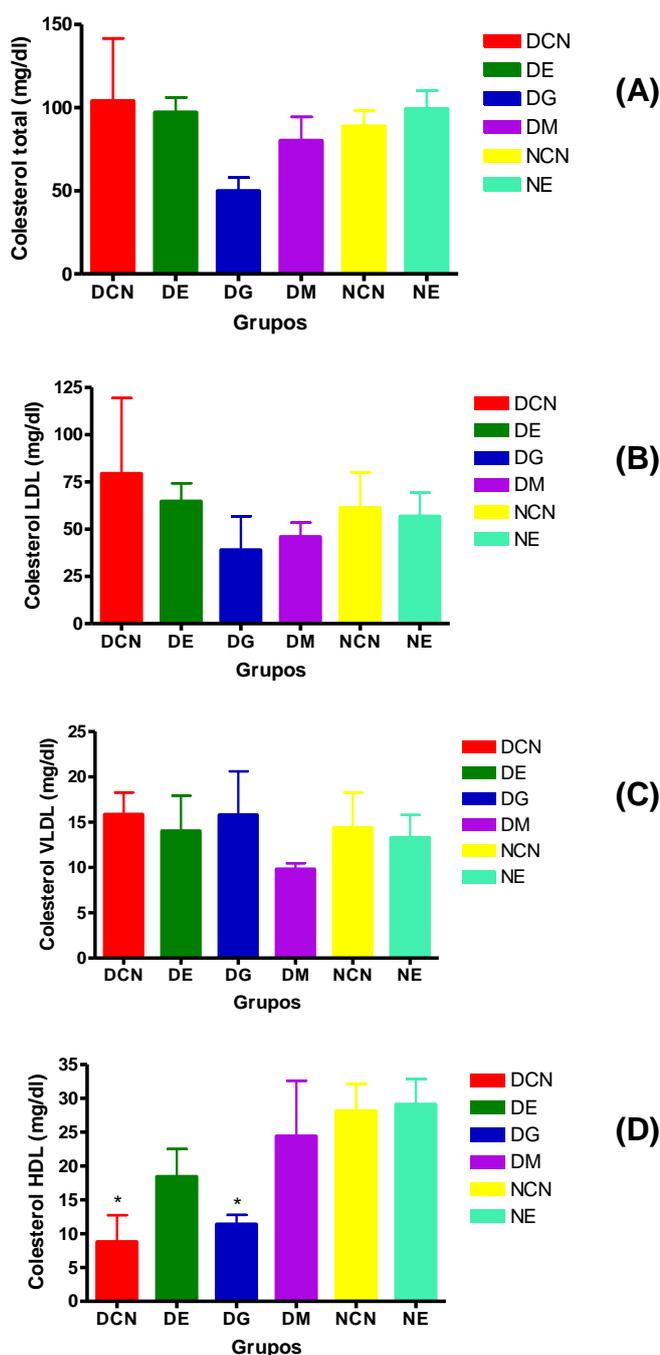
**Gráfico 15:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Prova de função pancreática, níveis séricos de amilase. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

## Avaliação do perfil lipídico

A avaliação do perfil lipídico compreendeu as dosagens de triglicérides, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL), apresentados nos gráficos 16 e 17.



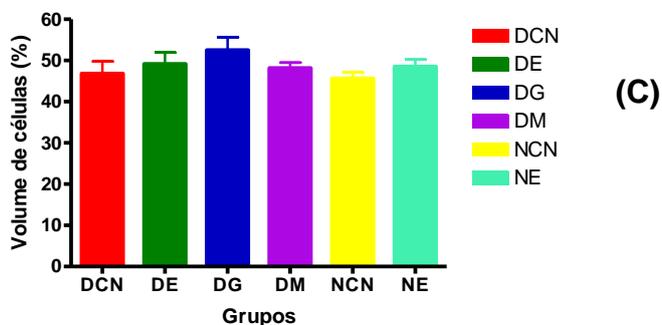
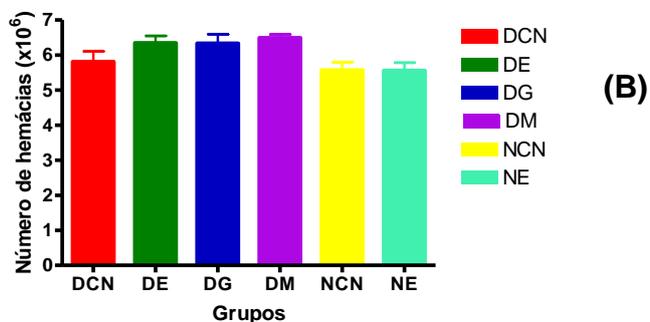
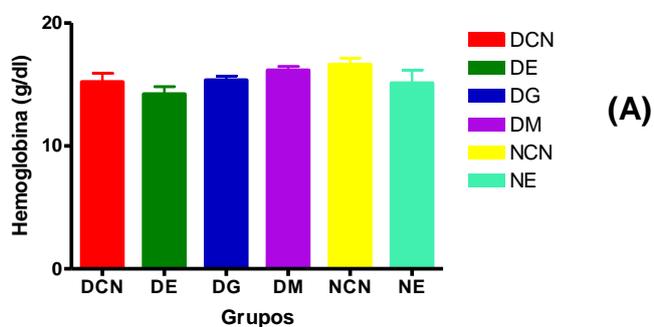
**Gráfico 16:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Perfil lipídico, níveis séricos de triglicérides. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).

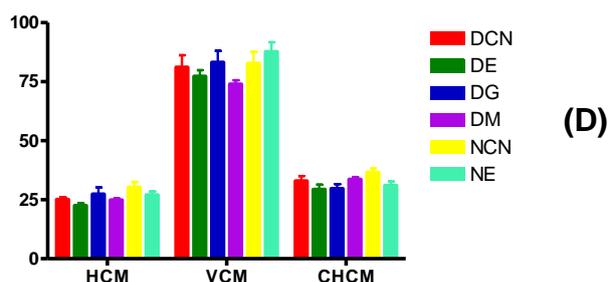


**Gráfico 17:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Perfil lipídico, níveis séricos de colesterol total (A) e frações (colesterol LDL (B), colesterol VLDL (C), e colesterol HDL (D)). DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais normais.

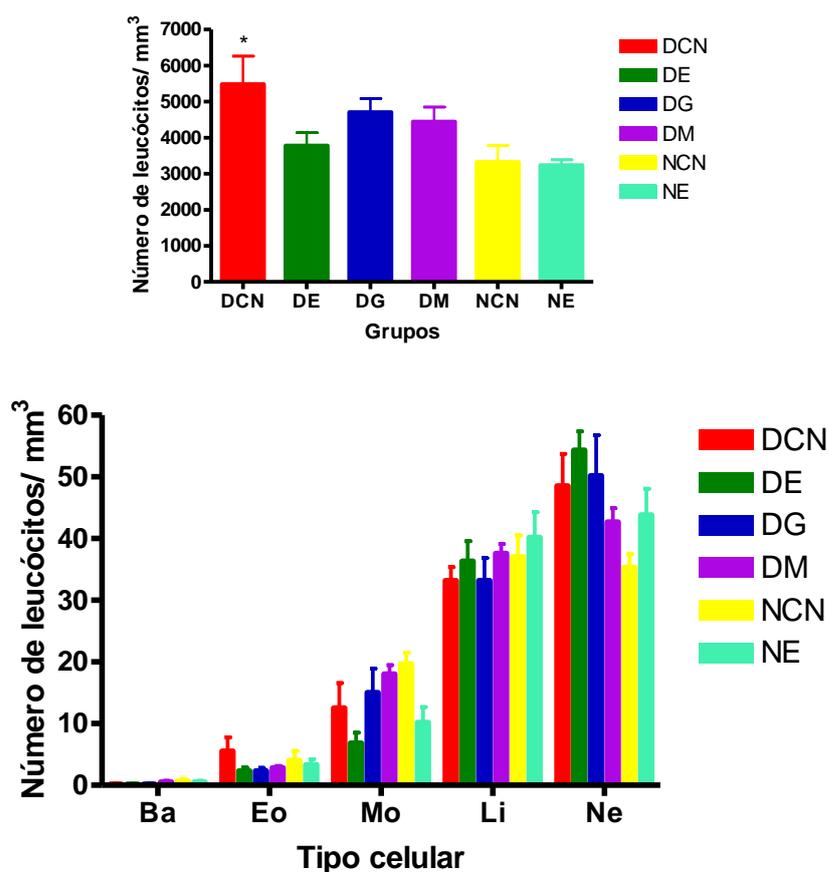
## Parâmetros hematológicos

O perfil hematológico foi avaliado através de um hemograma completo, envolvendo dosagens de hemoglobina, hematócrito, hematimetria, índices hematimétricos (eritograma) e leucometrias global e específica (leucograma), conforme ilustrados nos Gráficos 18 e 19.





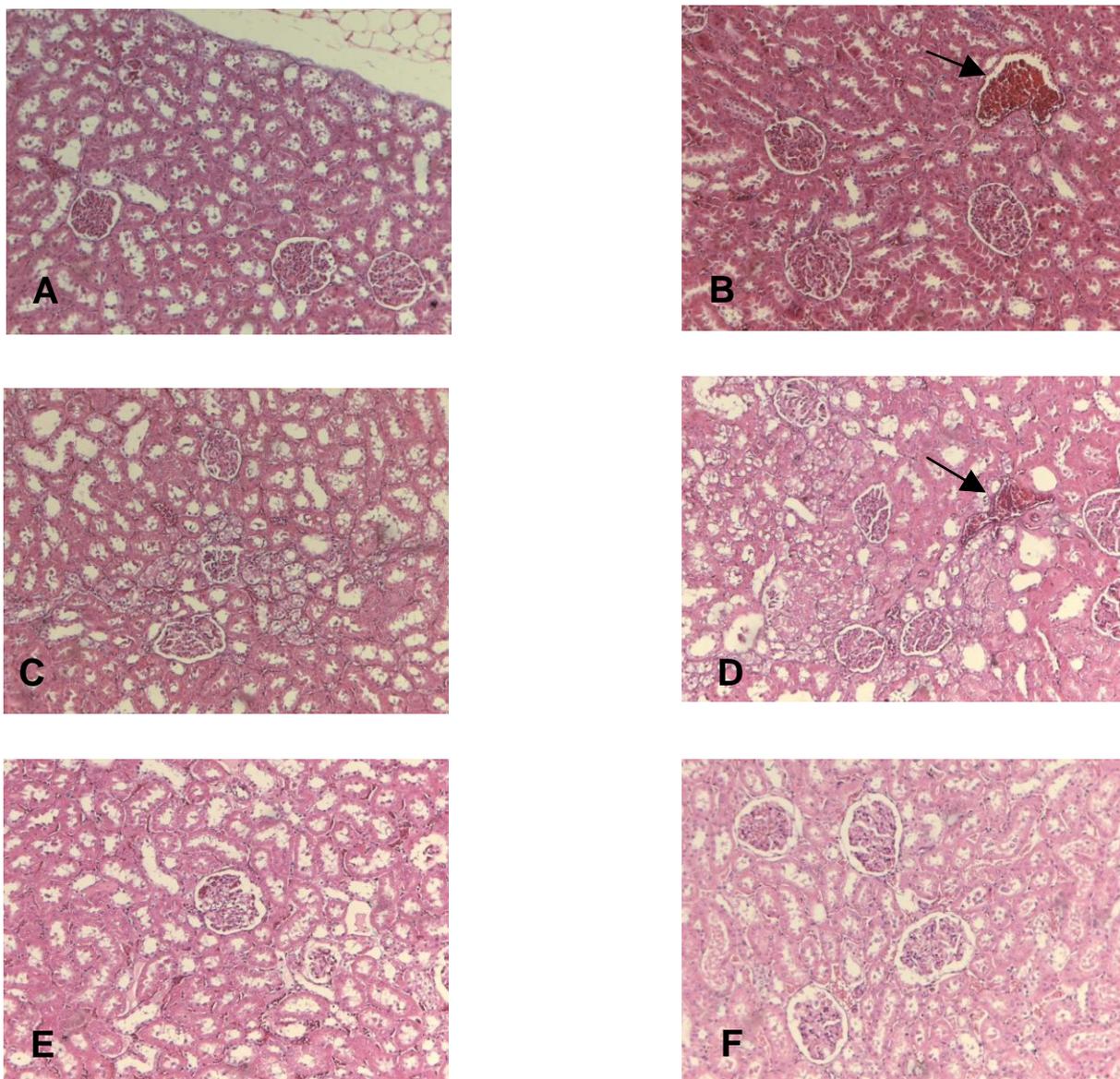
**Gráfico 18:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Hemograma completo, eritrograma. Concentração de hemoglobina (A), número de células (hematimetria) (B), volume de células (hematócrito) (C) e índices hematimétricos (HCM, hemoglobina corpuscular médio, VCM, volume corpuscular médio, CHCM, concentração média da hemoglobina corpuscular) (D). DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6).



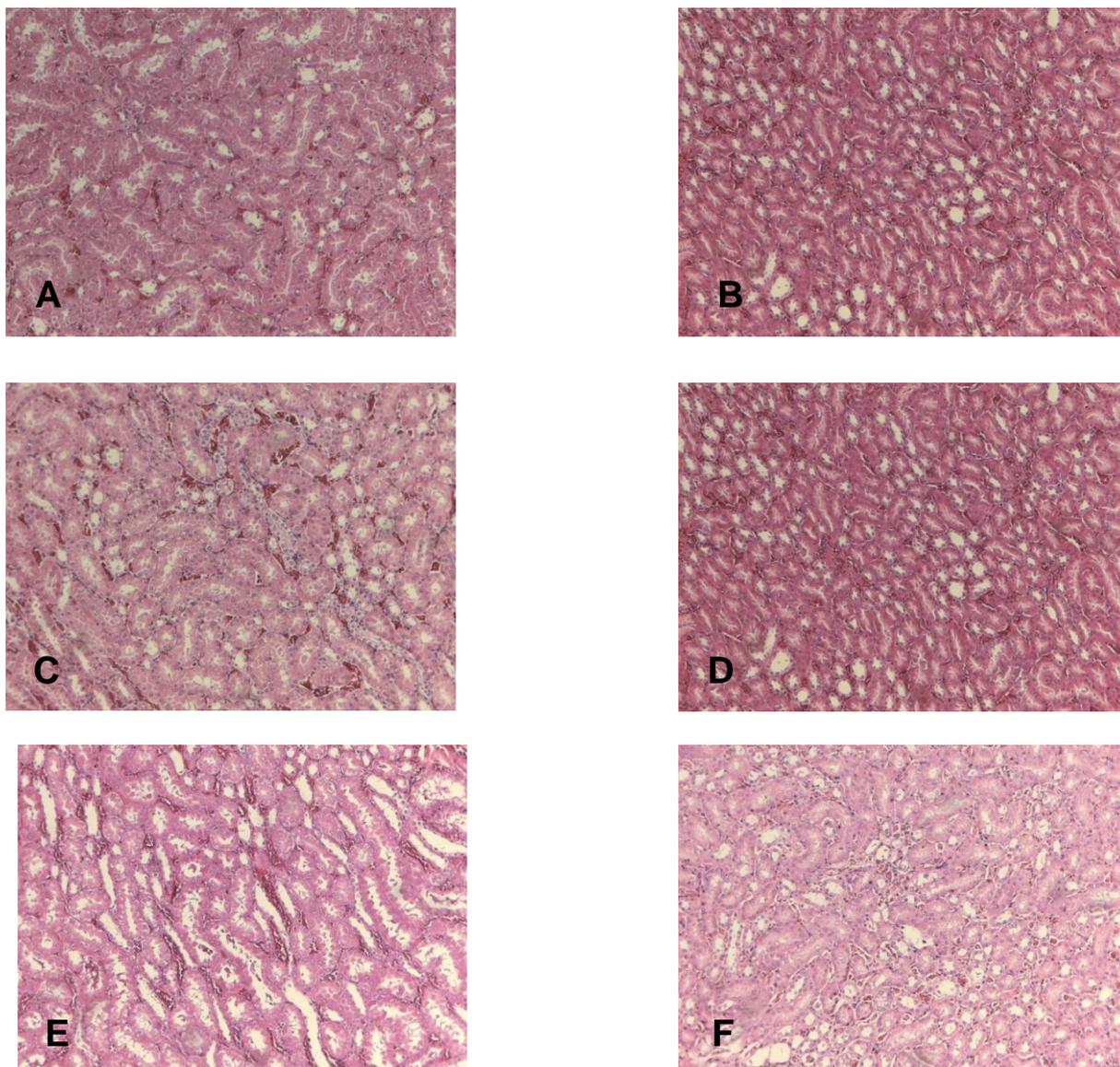
**Gráfico 19:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. Hemograma completo, leucograma. Leucometria global (A), leucometria específica (B). Tipos celulares: Ba, basófilo; Eo, eosinófilo; Mo, monócito; Li, linfócito; Ne, neutrófilo. DCN corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); DE corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/kg), que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6); DG corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de glibenclamida (3mg/Kg) (n=6); DM corresponde ao grupo de animais diabéticos, induzidos por aloxano (80mg/Kg), que receberam solução de metformina (120mg/Kg) (n=6); NCN corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam apenas veículo (solução DMSO 3% em NaCl 0,9%) (n=6); NE corresponde ao grupo de animais não diabéticos que receberam solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* (80mg/Kg) (n=6). \* Aumento significativo ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais normais.

## Avaliação histológica

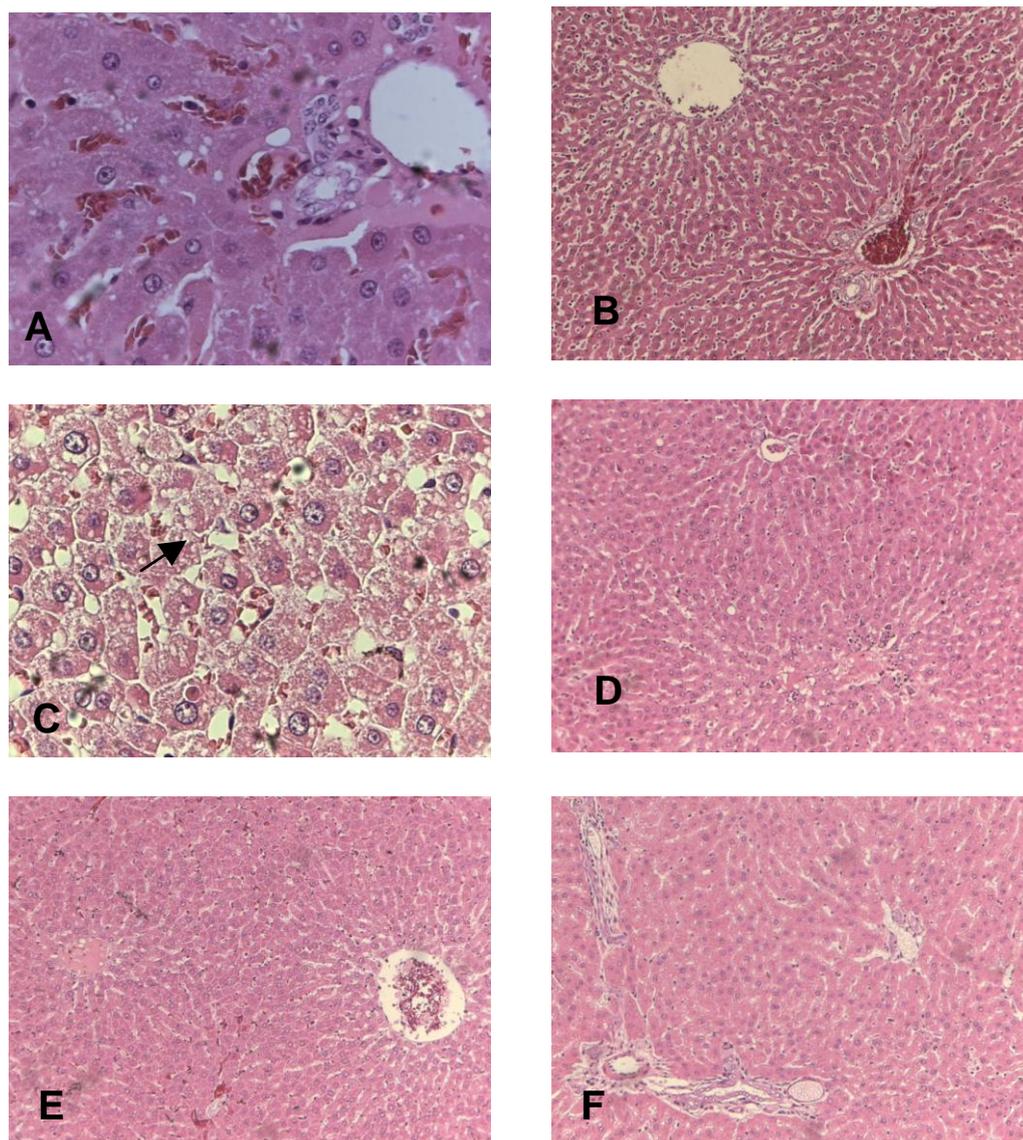
As Fotografias 3, 4 e 5 mostram secções dos rins e fígado dos animais diabéticos e não diabéticos.



**Fotografia 3:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*, análise histológica do córtex renal. **A**, córtex renal de ratos normais controle negativo (NCN); **B**, córtex renal de ratos normais tratados com extrato (NE); **C**, córtex renal de ratos diabéticos controle negativo (DCN); **D**, córtex renal de ratos diabéticos tratados com extrato (DE); **E**, córtex renal de ratos diabéticos tratados com glibenclamida (DG); **F**, córtex renal de ratos diabéticos tratados com metformina (DM). As setas em **B** e **D** indicam a presença de vasos sanguíneos ligeiramente congestionados. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 25X.



**Fotografia 4:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*, análise histológica da medula renal. A, medula renal de ratos normais controle negativo (NCN); B, medula renal de ratos normais tratados com extrato (NE); C, medula renal de ratos diabéticos controle negativo (DCN); D, medula renal de ratos diabéticos tratados com extrato (DE); E, medula renal de ratos diabéticos tratados com glibenclamida (DG); F, medula renal de ratos diabéticos tratados com metformina (DM). Coloração hematoxilina-eosina, aumento 25X.



**Fotografia 5:** Avaliação do potencial toxicológico do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*, análise histológica do fígado. **A**, fígado de ratos normais controle negativo (NCN); **B**, fígado de ratos normais tratados com extrato (NE); **C**, fígado de ratos diabéticos controle negativo (DCN); **D**, fígado de ratos diabéticos tratados com extrato (DE); **E**, fígado de ratos diabéticos tratados com glibenclamida (DG); **F**, fígado de ratos diabéticos tratados com metformina (DM). As setas em **C** indicam a presença de pontos esbranquiçados nos hepatócitos do grupo DCN. Coloração hematoxilina-eosina, aumento 25X, com exceção de **A** e **C**, com aumento 40X.

## 5.4 RESUMO DOS RESULTADOS

### Estudo fitoquímico

- Análise fitoquímica do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*: presença de compostos fenólicos (flavonóides, taninos e antocianidinas), esteróides e alcalóides
- Determinação do conteúdo de fenóis totais:  $326 \pm 0,06$  mg de fenóis/g de extrato equivalente ao ácido tânico
- Determinação do conteúdo de flavonóides:  $82,5 \pm 0,23$  mg de flavonóides/g de extrato equivalentes a rutina
- Determinação do perfil cromatográfico por CLAE: presença de ácido clorogênico

### Estudo biológico

- Atividade citotóxica contra *Artemia salina*:  $IC_{50} > 1000$   $\mu\text{g/ml}$
- Atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres – Método do DPPH:  $IC_{50} 3,1$  (2,0 – 4,5)  $\mu\text{g/ml}$
- Determinação do poder de redução:  $EC_{50} 10,85 \pm 0,65$   $\mu\text{g/ml}$

### Estudo farmacológico

- Efeito hipoglicemiante do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos

#### a) Efeito agudo:

Curva glicêmica: redução significativa da glicemia ( $p < 0,001$ ) dos animais do grupo DE em todos os tempos, em relação à glicemia de jejum do mesmo grupo. Nenhuma alteração significativa da glicemia dos animais do grupo NE.

Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG): redução significativa da glicemia ( $p < 0,001$ ) dos animais do grupo DE em todos os tempos, em relação à glicemia do tempo 0,5 do mesmo grupo. Redução fisiológica da glicemia em ratos normais.

b) Efeito sub-crônico: redução significativa da glicemia ( $p < 0,001$ ) dos animais do grupo DE em todos os tempos, em relação à glicemia de jejum do mesmo grupo. Nenhuma alteração significativa da glicemia dos animais do grupo NE.

c) Efeito crônico: as glicemias dos animais diabéticos de uma forma geral não retornaram a níveis basais. Redução significativa da glicemia ( $p < 0,05$ ) dos animais do grupo DE em relação aos animais do grupo DCN.

- Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos

a) Massa corporal: ratos diabéticos com massa corporal menor que a dos ratos normais. Nenhuma alteração significativa dentro de cada grupo, ao longo do tratamento.

b) Consumo de ração: maior consumo de ração entre os ratos diabéticos, quando comparado ao consumo dos ratos normais. Nenhuma alteração significativa dentro de cada grupo, ao longo do tratamento.

c) Consumo de água: maior ingestão de água entre os ratos diabéticos, quando comparado ao consumo dos ratos normais. Nenhuma alteração significativa dentro de cada grupo, ao longo do tratamento.

- Avaliação toxicológica

a) Funções hepática e biliar: aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de AST e ALT em DCN  
aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de AST em DM  
aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de BT e BD em DM;  
aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de FA em DCN

b) Perfil proteico: nenhuma alteração significativa dos níveis de proteínas totais, albumina e globulina

c) Função renal: aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de ureia em DCN  
nenhuma alteração significativa nos níveis de creatinina

d) Função pancreática: nenhuma alteração significativa nos níveis de amilase

e) Perfil lipídico: nenhuma significativa nos níveis de TG  
nenhuma alteração significativa nos níveis de CT, LDL e VLDL  
redução dos níveis de HDL em DCN e DG

f) Parâmetros hematológicos: nenhuma alteração significativa no eritrograma  
aumento da leucometria global em DCN

- Avaliação histológica

Presença de ligeira congestão nos vasos sanguíneos do córtex renal de DE e NE

Presença de pontos esbranquiçados no interior de hepatócitos de DCN

## 6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

Como pode ser observado na Tabela 1 (página 83), o extrato metanólico revelou a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos, esteróides, alcalóides e antocianidinas. Alguns flavonóides, esteróis e triterpenóides, alcalóides e ácidos fenólicos já são conhecidos como princípios bioativos antidiabéticos (; IVORRA, PAYÁ e VILLAR, 1989). Além disso, flavonóides e outros polifenóis agem também como antioxidantes, sendo capazes de exercer a retirada de radicais livres (CHAILLOU e NAZARENO, 2006).

O conteúdo de fenóis totais e flavonóides foram determinados e relacionados com a atividade antioxidante do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*. O extrato apresentou valores elevados tanto de fenóis totais quanto de flavonóides. Assim, observa-se que há uma correlação direta entre a capacidade antioxidante do extrato e seus conteúdos de fenóis totais e flavonóides. No entanto, a atividade antioxidante não pode ser atribuída somente a uma classe de compostos. Os flavonóides e seus glicosídeos são conhecidos por possuírem atividade antioxidante. Propriedades antioxidantes também já foram relatadas para antraquinonas (CAZAROLLI, 2004). Dessa forma, a presença desses compostos certamente está contribuindo para a atividade antioxidante dessa espécie.

Os flavonóides constituem uma ampla classe de polifenóis de relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais (SIMÕES *et al.*, 2001) e muitas das propriedades biológicas conhecidas estão relacionadas à estrutura química e habilidade de interagir com moléculas orgânicas (SAIJA *et al.*, 1995). A estrutura química dos polifenóis determina a taxa e a extensão de absorção intestinal, além da natureza dos metabólitos circulantes no plasma.

A análise do perfil cromatográfico por CLAE do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* revelou a presença de ácido clorogênico (Gráfico 2, página 85).

O ácido clorogênico, assim como o flavonóide isoorientina, que também são encontrados em outras espécies de plantas usadas como antidiabéticos, têm sido apontados como os compostos hipoglicemiantes de *Cecropia obtusifolia* (ANDRADE-CETTO e WIEDENFELD, 2001).

## 6.2 ESTUDO BIOLÓGICO

### 6.2.1 Atividade citotóxica contra *Artemia salina* (“Brine Shrimp Test”)

A avaliação de citotoxicidade é baseada na taxa de mortalidade de *Artemia salina* induzida pelo extrato. *A. salina* é um pequeno crustáceo usado como modelo para diversos estudos fisiológicos e que tem mostrado boa correlação com a citotoxicidade de compostos presentes em tumores sólidos (McLAUGHLIN, CHANG e SMITH, 1991).

O extrato de *C. pachystachya* não apresentou toxidez contra *Artemia salina* ( $IC_{50} > 1000\mu\text{g/ml}$ ).

### 6.2.2 Atividade antioxidante

Os métodos mais comumente utilizados para avaliação da atividade antioxidante por serem fáceis, rápidos e sensíveis, são aqueles que envolvem compostos cromogênicos de um radical que simula as espécies reativas de oxigênio (ERO's). A presença do antioxidante leva ao desaparecimento desses radicais cromogênicos. Um exemplo é o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm em solução metanólica, pois possui uma coloração violeta intensa (ARNAO, 2000). Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND, CUVELIER e BERSET, 1995). O extrato metanólico apresentou um IC<sub>50</sub> de 3,1 µg/ml, semelhante a padrões como rutina (2,52 µg/ml) e quercetina (0,98 µg/ml).

Outro método que avalia a atividade antioxidante é a determinação do poder de redução, que indica a capacidade de um composto de doar elétrons, e conseqüentemente, de reduzir os intermediários oxidados por processos de peroxidação lipídica (OYAZU, 1986). O extrato metanólico apresentou um IC<sub>50</sub> de 10,65 µg/ml, estatisticamente diferente do valor encontrado para o ácido ascórbico.

É clara a relação entre a capacidade antioxidante e o poder de redução de certos compostos. De acordo com Mier *et al.* (1995), o poder de redução de um composto pode servir como um indicador do potencial da atividade antioxidante, o que corrobora a idéia de que o extrato de *C. pachystachya* tem significativa ação antioxidante.

Fatores nutricionais, incluindo as substâncias antioxidantes, possuem grande influência na evolução do diabetes melito e suas complicações (ALBERT e ZIMMET, 1998). Um desequilíbrio entre estresse oxidativo e mecanismos de defesa antioxidante nos diabéticos pode resultar em danos celulares e aceleração das complicações diabéticas. A administração de substâncias antioxidantes pode prevenir ou retardar o desenvolvimento dessas complicações.

O efeito antioxidante de plantas usadas no tratamento do diabetes foi demonstrado por Letitia, Cune e Timothy, 2002. De acordo com esses autores, o benefício do uso de antioxidantes na prevenção das complicações do diabetes suporta e valida seu uso na medicina tradicional. Além disso, os antioxidantes são importantes na prevenção do diabetes, uma vez que baixos níveis plasmáticos desses antioxidantes implicam em um fator de risco para o desenvolvimento dessa doença e progressão da mesma, com altos níveis de radicais livres circulantes.

Com base nos resultados encontrados obtidos na avaliação da atividade antioxidante, conclui-se que o extrato metanólico de *C. pachystachya* possui substâncias doadoras de elétrons e hidrogênio, capazes de neutralizar radicais livres. Este efeito converte os radicais livres em produtos mais estáveis. Esse extrato também pode reduzir intermediários oxidativos dos processos de peroxidação lipídica, portanto podem agir como antioxidante primário e secundário.

Entre os mecanismos de ação do aloxano, destaca-se a degeneração de células  $\beta$  pancreáticas pelo acúmulo de radicais livres citotóxicos. Após sua administração o aloxano se encontra concentrado nas células  $\beta$  pancreáticas e fígado, onde é reduzido a ácido dialúrico. Esse ácido é instável em soluções aquosas, sofrendo rápida oxidação a aloxano, novamente. Esse ciclo redox é acompanhado pela geração de espécies reativas de oxigênio, potencialmente citotóxicas (JÖRNS *et al.*, 1997).

## 6.3 ESTUDO FARMACOLÓGICO

### 6.3.1 Atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos

#### **Indução de diabetes melito**

O aloxano é uma substância que provoca a destruição específica das células  $\beta$  do pâncreas, levando ao estado de deficiência de insulina. Os níveis de glicemia obtidos nos animais são bastante variados. Essa variação pode ocorrer em função das doses administradas, bem como em função da idade do animal ou ainda da raça, sexo e estado nutricional (FISCHER, 1985; VERSPOHL, 2002).

Nesse trabalho foi utilizada a dose de 80mg de aloxano/kg. Esta dose destrói parcialmente a população de células  $\beta$  e, nestas condições há secreção de insulina, mas não em quantidade suficiente para regular adequadamente os níveis glicêmicos. A administração de aloxano aumentou significativamente a concentração de glicose no sangue quando a comparada à glicemia de ratos não diabéticos, sendo, portanto, um método de indução do diabetes bastante válida para esse trabalho.

## Efeito hipoglicemiante

O tratamento agudo com extrato metanólico de *C. pachystachya* em ratos diabéticos produziu redução significativa dos níveis glicêmicos, conforme mostrado no Gráfico 3 (página 88). O máximo de redução ocorreu em 1,5 hora (60,5%). Esses resultados tornam-se mais significativos quando se compara os níveis de glicemia entre os ratos diabéticos tratados e os não tratados. As diferenças entre os grupos DCN e DE ocorre em todos os tempos analisados. Redução semelhante foi também observada nos animais diabéticos tratados com os controles positivos, glibenclamida (DG) e metformina (DM). Nos animais normais tratados com extrato não foi observada nenhuma alteração significativa da glicemia ao longo das 2 horas. No entanto, quando esses animais foram comparados com aqueles normais que receberam apenas veículo (DCN), houve redução em 1,5 (40,2%) e 2 horas (36,7%) após administração do extrato.

Os animais também foram submetidos a um teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O objetivo foi avaliar por quanto tempo o extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* exerceu seu efeito hipoglicemiante. Conforme pode ser observado no Gráfico 4 (página 89), aqueles diabéticos que foram tratados com extrato tiveram redução significativa da glicemia mesmo 12 horas após o tratamento com uma única dose da solução do extrato (67,5%). Esses animais apresentaram também uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) da glicemia em diversos pontos de sua curva glicêmica, ao serem comparados com o grupo diabético controle negativo (DCN). O tratamento com ambos os controles positivos, glibenclamida (DG) e metformina (DM), também produziu redução significativa da glicemia em diversos pontos da curva, inclusive 12 horas após sua administração. Enquanto extrato e glibenclamida reduziram a glicemia próxima a níveis basais (116 e 90mg/dl, em 12 horas, respectivamente; Gráfico 4, página 89), o tratamento com metformina levou os animais a um estado hipoglicêmico (48 mg/dl, em 12 horas; Gráfico 4, página 89). Isso contradiz com os mecanismos de ação desse hipoglicemiante, já que a metformina não atua diretamente no aumento da secreção de insulina, ao contrário do que ocorre com a glibenclamida (RAMALHO, 2002).

Entre os animais dos grupos normais (Gráfico 4, página 89), não foi observada nenhuma diferença significativa entre aqueles tratados com veículo e aqueles que receberam solução do extrato metanólico de *C. pachystachya*. No entanto, observou-se que em ambos os grupos, normal controle negativo (NCN) e normal extrato (NE) houve redução da glicemia após 12 horas do tratamento com uma única dose de solução (52,1%, para NE; e 43,6%, para NCN) em relação ao tempo 0. Isso mostra que há uma tendência fisiológica de redução da glicemia em animais normais em decorrência do metabolismo normal da glicose. Eles não possuem alteração de células  $\beta$  pancreáticas, uma vez que não foram submetidos a nenhum tipo de indução com agente diabetogênico. Tanto a secreção e a ação da insulina, como as absorções hepática, muscular e intestinal de glicose foram normais nesses animais, refletindo na redução fisiológica da glicemia. Por outro lado, os animais diabéticos, não possuíam mais essa integridade no metabolismo de glicose, já que neles ocorreu destruição parcial das células  $\beta$  pancreática. Por esse motivo não foi observada uma redução fisiológica da glicemia no grupo DCN. Dessa forma, a redução observada nos animais diabéticos tratados com extrato pode ser atribuída ao seu efeito hipoglicemiante agudo e não apenas a uma tendência fisiológica.

No efeito hipoglicemiante sub-crônico (Gráfico 5, página 90), os animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *C. pachystachya* (DE) apresentaram uma redução significativa da glicemia em diversos pontos da curva, principalmente após 6 horas da administração da solução de extrato, onde foi observada uma redução de 77,6% da glicemia inicial (glicemia de jejum). Os resultados também são significativos quando se compara os níveis de glicemia entre os ratos diabéticos tratados com extrato (DE) e os que recebem apenas veículo (DCN). Nos grupos que foram tratados com glibenclamida ou metformina também foi observada uma redução significativa da glicemia após 6 horas da administração dessas soluções. Diferença significativa também foi detectada em relação ao grupo DCN. Observa-se, no entanto, que as glicemias de jejum de todos os animais diabéticos encontram-se elevadas. Isso deixa claro que apesar de haver redução no decorrer das 6 horas de avaliação dessa curva glicêmica, o tratamento com uma única administração diária de extrato, glibenclamida e metformina não foi suficiente para manter as glicemias

de jejum em níveis basais (< 99 mg/dl), apesar dessas serem significativamente menores que as do grupo controle negativo (DCN).

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os animais não diabéticos (NCN e NE), conforme pode ser observado no Gráfico 5 (página 90).

Os mesmos animais que foram submetidos ao ensaio de efeito sub-crônico, tiveram seu tratamento prolongado por mais 36 dias, perfazendo um total de 42 dias de tratamento. Conforme pode ser observado no Gráfico 6 (página 91), os animais diabéticos que receberam apenas veículo (DCN) mantiveram suas glicemias elevadas.

A curva de evolução das glicemias semanais dos animais diabéticos tratados com extrato (DE) apresentou redução significativa ( $P < 0,05$ ) com relação aos animais que receberam apenas veículo (DCN) (Gráfico 6, página 91). Porém, no decorrer do tratamento, a glicemia de jejum desses animais não atingiu níveis basais, fato que também foi observado para os animais tratados com controles positivos (DG e DM). Isso pode estar relacionado ao grau de destruição das células  $\beta$  ao longo de 42 dias, causado pela indução com o aloxano, comprometendo de forma significativa a secreção de insulina.

Tahara *et al.* (2008) afirma que a indução do diabetes com aloxano não é um modelo adequado para avaliação de secretagogos de insulina, como as sulfonilureias. Isso se deve ao fato de que o aloxano causa uma redução significativa no conteúdo de insulina pancreática, levando a um quadro de resistência a esse hormônio (TAHARA *et al.*, 2008).

Sabe-se que glibenclamida e metformina atuam na presença de insulina. A primeira atua diretamente, estimulando sua secreção; e a segunda, indiretamente, aumentando o transporte de glicose na membrana de células responsivas à insulina. Portanto, uma redução maciça na secreção desse hormônio afeta diretamente a ação hipoglicemiante desses medicamentos.

O extrato metanólico não pareceu atuar diretamente na secreção de insulina, uma vez que ele não causou efeito hipoglicemiante em animais normais (Gráfico 3, página 88; Gráfico 4, página 89; Gráfico 5, página 90; Gráfico 6, página 91). No entanto, sua ação pode necessitar da presença de insulina, de forma semelhante à metformina (RAMALHO, 2002).

Resultados obtidos em modelos animais (ANDRADE-CETTO e WIEDENFELD, 2001) e triagens clínicas (HERRERA-ARELLANO *et al.*, 2004; REVILLA-MONSALVE *et al.*, 2007) excluem a possibilidade de que as propriedades antidiabéticas de uma outra espécie, a *Cecropia obtusifolia*, podem ser devidas a efeitos relacionados à secreção de insulina, como acontece com a glibenclamida. Andrade-Cetto *et al.* (2008) atribuíram parte do efeito hipoglicemiante dessa espécie a uma modulação da absorção intestinal de glicose, através da inibição de  $\alpha$ -glicosidase, sem excluir a possibilidade de outro mecanismo antidiabético.

Outro fato a ser considerado é o tempo de ação do extrato metanólico. No TOTG (Gráfico 4, página 89), houve redução dos níveis glicêmicos até 12 horas após o tratamento. Porém, as glicemias de jejum ao longo de 42 dias não atingiram níveis basais (Gráfico 6, página 91). Provavelmente, a administração de duas doses diárias do extrato poderia refletir em um melhor controle glicêmico nos animais diabéticos.

A presença de ácido clorogênico no extrato metanólico de *C. pachystachya* pode ser correlacionada, de certa forma, à atividade hipoglicemiante apresentada por esse extrato. O ácido clorogênico foi identificado como um inibidor específico de glicose-6-fosfato translocase, em microsomas de fígado de ratos (HEMMERLE *et al.*, 1997). A marcação simultânea de gliconeogênese e glicogenólise com inibidores de glicose-6-fosfato translocase resultou na queda de produção de glicose hepática (ANDRADE-CETTO e HEINRICH, 2005). Alonso-Castro *et al.* (2008) testaram o extrato aquoso de *C. obtusifolia*, contendo 0,7 mg/g de ácido clorogênico, em adipócitos, e verificaram que este extrato pode agir potencializando a ação da insulina ou ativando a via de sinalização paralela à via da insulina. Além disso, eles relataram que ocorreu estímulo na captação de glicose por tecidos periféricos, parecendo ser esta a terapêutica mais promissora para o diabetes tipo 2.

Conforme mencionado acima, o extrato metanólico de *C. pachystachya* não exerceu efeito hipoglicemiante em ratos normais e, portanto, não parece atuar estimulando a secreção de insulina. Isso pode ser devido à presença do ácido clorogênico que atua na captação de glicose e não diretamente na secreção de insulina (ANDRADE-CETTO e HEINRICH, 2005)

Nicasio *et al.* (2005) mostrou que o efeito hipoglicemiante do ácido clorogênico é dose-dependente. Dessa forma, concentrações mais elevadas dessa substância exibem maior redução da glicemia. Porém, esse efeito não foi observado para o extrato metanólico de *C. pachystachya*. Para se definir qual concentração de extrato seria utilizada nesse estudo, foram avaliadas concentrações de 10, 20, 40, 80, 100 e 120 mg/ml. Nesse caso, o aumento da atividade hipoglicemiante não foi proporcional ao aumento da concentração de extrato, visto que a concentração de 80 mg/ml foi a que apresentou maior efeito hipoglicemiante (dados não mostrados). Isso nos permite concluir que o mecanismo de ação do extrato metanólico de *C. pachystachya* não se deve exclusivamente à presença do ácido clorogênico.

A atividade hipoglicemiante do extrato metanólico de *C. pachystachya* pode também estar relacionada ao elevado teor de flavonóides detectados na dosagem desses metabólitos. Entre os mecanismos de ação desses compostos, tem sido sugerida sua atividade antidiabética, exercendo importante inibição da enzima aldose redutase (MATSUDA, MORIKAWA e YOSHIKAWA, 2002). Essa enzima desempenha papel fundamental na via do poliol, reduzindo glicose a sorbitol. O acúmulo de sorbitol, característico no diabético, leva ao desenvolvimento de complicações crônicas, tais como nefropatia, neuropatia e catarata. Dessa forma, o extrato metanólico de *C. pachystachya*, além de exercer seu efeito hipoglicemiante, pode prevenir o desenvolvimento dessas complicações diabéticas de forma direta, através da ação de flavonóides, além de sua ação indireta, através de seu potencial antioxidante, auxiliando na remoção de espécies reativas de oxigênio.

### 6.3.2 Evolução do tratamento crônico com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* em ratos normais e diabéticos e avaliação do potencial toxicológico

#### **Evolução do tratamento**

Durante os 42 dias de tratamento foram acompanhados também a evolução da massa corporal e os consumos de água e ração de cada animal. Tais parâmetros foram registrados diariamente.

O Gráfico 7 (página 92) representa as médias semanais das massas corporais. Não foi observada nenhuma diferença significativa no decorrer dos tratamentos. Entretanto, observou-se que os animais diabéticos apresentaram de uma forma geral, massa corporal menor que os animais normais.

O Gráfico 8 (página 93) representa as médias do consumo de ração durante o período de estudo. Não foi detectada nenhuma diferença significativa entre os animais do mesmo grupo já que estes mantiveram constante o consumo de ração. Porém, como esperado, houve um maior consumo de ração pelos animais diabéticos quando comparados com os animais normais. A polifagia é uma das três principais características do diabetes e é oriunda da falta de glicose, no espaço intracelular, que por sua vez determina ao cérebro que ative o centro da fome (LERCO *et al.*, 2003).

Conforme pode ser observado no Gráfico 9 (página 94) há um aumento significativo no consumo de água nos grupos de animais diabéticos, quando estes são comparados aos normais, condizendo com o quadro fisiopatológico da doença. A polidipsia presente nos animais diabéticos se deve à hiper osmolaridade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular, a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é percebida por receptores cerebrais ativados por osmolaridade, desencadeando sede intensa (LERCO et al., 2003).

Apesar de não levar as glicemias de jejum aos níveis basais durante os 42 dias de tratamento (Gráfico 6, página 91), o extrato metanólico de *C. pachystachya* conseguiu manter um bom estado geral dos animais diabéticos ao longo do tratamento. Esses animais, de forma semelhante àqueles normais, tiveram tônus e reflexos conservados, além da ausência de alterações na pelagem e no odor da urina. Por outro lado, nos outros animais diabéticos (DCN, DG e DM), foi observado um comprometimento acentuado e progressivo do estado geral, caracterizado por apatia, alterações na pelagem e odor forte da urina (polaciúria).

### **Avaliação do potencial toxicológico**

Ao final de 42 dias de tratamento os animais foram sacrificados e o sangue coletado para avaliar o efeito da administração do extrato metanólico de *C. pachystachya*. Essa avaliação envolveu a análise de parâmetros bioquímicos, incluindo provas de funções hepática e biliar, renal e pancreática, avaliação dos perfis lipídico e protéico; e parâmetros hematológicos.

## Avaliação das funções hepática e biliar

O fígado é o órgão central do metabolismo no organismo. Ele realiza inúmeras operações metabólicas nos constituintes sanguíneos, que chegam ao fígado como produtos de degradação ou nutrientes e, por sua vez, muitas atividades hepáticas estão diretamente refletidas nas várias substâncias circulantes no sangue e também presentes em outros fluidos corporais. Embora as funções hepáticas afetem muitos metabólitos, alguns correlacionam-se muito bem com a integridade estrutural e funcional do fígado e podem ser determinados por alguns testes de função hepática, ou provas de função hepática e biliar. Esses testes envolvem a avaliação da função hepatocelular (que inclui entre outras dosagens, os níveis séricos de aminotransferases e bilirrubina), sistema biliar (dosagem de fosfatase alcalina e outras enzimas “obstrutivas”, por exemplo), além de determinações específicas (como antígenos e anticorpos de hepatites, ceruloplasmina, entre outros) (WIDMANN, 2001).

As aminotransferases, ou transaminases na nomenclatura mais antiga, são enzimas que catalisam a transferência reversível de um grupo amina entre um aminoácido e um  $\alpha$ -cetoácido. As duas aminotransferases mais frequentemente determinadas são a alanina aminotransferase (ALT), antigamente conhecida como “glutamato-piruvato transaminase (TGP)” e a aspartato aminotransferase (AST), anteriormente denominada de “glutamato-oxaloacetato transaminase (TGO)”. As aminotransferases estão amplamente distribuídas no organismo, mas são particularmente abundantes no fígado, devido ao papel fundamental desses órgãos na síntese protéica e no redirecionamento dos aminoácidos para outras vias bioquímicas. Os hepatócitos são praticamente as únicas células com alto conteúdo de ALT, embora rins, coração e músculo esquelético apresentem quantidades moderadas. Pâncreas, baço, pulmões e eritrócitos possuem quantidades menores desta enzima. A ALT sérica possui uma especificidade relativamente elevada pelo dano hepático. AST está abundantemente presente no miocárdio, músculo esquelético, cérebro e rins. As aminotransferases são excelentes indicadores do dano hepático, quando ambas se encontram elevadas (HENRY, 1999).

A dosagem de bilirrubina também tem por objetivo avaliar a função hepática. A bilirrubina é o produto da degradação do grupo heme, em que grande parte (85 a 90%) é resultado da degradação da hemoglobina e uma parcela menor (10 a 15%) é resultante de outros compostos, como a mioglobina. Quando na forma de tetrapirrol de bilirrubina, ela é insolúvel e denominada bilirrubina indireta ou não conjugada. Já na forma conjugada ao ácido glicurônico, torna-se hidrossolúvel e é denominada de bilirrubina direta ou conjugada. A bilirrubina no sangue normal, em sua maior parte, compreende a forma insolúvel, ligada à albumina. Também existem quantidades geralmente pequenas da forma hidrossolúvel conjugada no sangue. Tanto a quantidade total quanto as proporções relativas das frações conjugada e não conjugada da bilirrubina são de extrema utilidade no diagnóstico da icterícia e das hepatopatias (WIDMANN, 2001).

As fosfatases são enzimas que agem em compostos contendo unicamente grupos fosfatos, clivando a porção fosfato (uma atividade denominada de monohidrolase do éster ortofosfato). Eritrócitos, plaquetas, fígado e baço apresentam pequenas quantidades de fosfatase ácida, que também pode ser encontrada no leite humano e é muito concentrado no líquido seminal. A fosfatase alcalina (ALP) está amplamente distribuída ao longo das superfícies membranosas das células metabolicamente ativas. Os tecidos com atividade muito elevada de ALP compreendem ossos, fígado, intestino, rins, leucócitos e plaquetas. A ALP desses diferentes órgãos apresenta algumas propriedades químicas e físicas diferentes, permitindo a distinção das diferentes fontes orgânicas através de ensaios especiais. A isoenzima hepática da ALP é originária das células do trato biliar. A excreção da bile no intestino constitui a via normal de eliminação da ALP hepática. A obstrução das vias biliares leva a uma retenção da ALP com extravasamento para o fluido intersticial e conseqüente absorção da ALP na circulação. A obstrução biliar também causa reabsorção da bilirrubina. Assim, a ALP é frequentemente utilizada para definição do diagnóstico na icterícia. As células tubulares renais possuem atividade ALP, que é normalmente secretada na urina, mas não é encontrada no soro em casos patológicos (WIDMANN, 2001).

Conforme pode ser observado nos Gráficos 10, 11 e 12 (páginas 95, 96 e 97, respectivamente) os valores de AST, ALT e fosfatase alcalina para os animais diabéticos que receberam apenas veículo (DCN) encontram-se mais elevados, o que pode ser indício de dano hepatocelular decorrente da evolução do quadro de diabetes. No grupo DM também foram detectados níveis mais elevados de AST, bilirrubinas total e direta, e de fosfatase alcalina. Elevações no nível sérico de AST são bastante inespecíficas, uma vez que essa aminotransferase é abundante nos tecidos cardíaco, esquelético, cerebral e renal. Os níveis aumentados de bilirrubinas total e direta, além da fosfatase alcalina, podem ser indicativos de dano hepático, porém não foi encontrado na literatura relatos a respeito desse possível efeito colateral para a metformina.

Os animais diabéticos que foram tratados com extrato metanólico de *C. pachystachya* apresentaram níveis de aminotransferase e fosfatase alcalina mais baixos que aqueles que receberam apenas veículo (Gráficos 10, 11 e 12, páginas 95, 96 e 97, respectivamente). Isso mostra que o extrato exerceu um efeito hepatoprotetor, provavelmente por reduzir o nível de espécies reativas de oxigênio geradas com o desenvolvimento do quadro de diabetes, induzido pelo aloxano. Por se tratar de uma droga diabetogênica com pouca especificidade pelas células  $\beta$  pancreáticas, o aloxano pode também sofrer captação pelos hepatócitos, o que explica o desenvolvimento de alterações hepáticas, como as que foram observadas para os animais diabéticos que não receberam nenhum tipo de tratamento (DCN).

Os animais normais que foram tratados com extrato também não apresentaram alteração nos níveis de aminotransferase, bilirrubinas e fosfatase alcalina (Gráficos 10, 11 e 12, páginas 95, 96 e 97, respectivamente). Isso reflete a ausência de hepatotoxicidade desse extrato.

## Avaliação do perfil protéico

O teor de proteínas é utilizado para ajudar a estabelecer o diagnóstico de muitas doenças que afetam as proteínas como um todo ou frações isoladas de proteínas. Mais especificamente, é utilizado para o diagnóstico, a avaliação e a monitorização de pacientes em casos de câncer (linfoma, mieloma), estados de perda intestinal/renal de proteínas, distúrbios imunológicos, disfunção hepática, comprometimento da nutrição e estados edematosos crônicos (HENRY, 1999).

A maioria das proteínas presentes no plasma sanguíneo, exceto o fator de von Willebrand (das células endoteliais) e as imunoglobulinas (dos plasmócitos) são produzidas no fígado. Assim, nos casos de dano hepático agudo ou crônico grave, pode haver aminoacidúria generalizada. Nesse caso os aminoácidos chegam ao sangue e urina como resultado da degradação maciça das proteínas nos hepatócitos em degeneração e da perda dos mecanismos reguladores da retenção dos aminoácidos livres pela incorporação à nova síntese protéica (WIDMANN, 2001).

Na disfunção hepatocelular de longa duração há um declínio dos níveis circulantes de proteínas plasmáticas. A albumina sérica e os fatores de coagulação dependentes da vitamina K fornecem os melhores índices para avaliação da gravidade da doença (WIDMANN, 2001).

Os níveis séricos de albumina declinam regularmente quando o dano hepatocelular tem duração superior a 3 semanas, depois de a albumina do sangue circulante ter sido substancialmente eliminada do organismo. Nas doenças em rápido desenvolvimento, a albumina sérica em declínio indica comprometimento maciço da função e tem um significado prognóstico pessimista. Nem todos os casos de hipoalbuminemia são decorrentes de hepatopatias. Os níveis séricos de albumina encontram-se reduzidos na desnutrição, nas patologias do trato alimentar com perda protéica (enteropatias), nas nefropatias com perda protéica, nas condições catabólicas prolongadas graves, como queimaduras, e naquelas condições em que há expansão do volume sanguíneo (WIDMANN, 2001).

As globulinas englobam as frações  $\alpha$  e  $\beta$ . As  $\alpha$ -globulinas fornecem pouca informação diagnóstica nas hepatopatias. Já a fração  $\beta$  inclui a  $\beta$ -lipoproteína, responsável pelo transporte de grande parte do colesterol plasmático. Esta fração se encontra elevada nas hepatites virais, cirrose biliar e na obstrução do trato biliar extra-hepático, em associação com altas concentrações de colesterol sérico (WIDMANN, 2001).

Nesse estudo, nenhuma diferença significativa foi detectada entre os grupos experimentais, conforme pode ser observado no Gráfico 13 (página 98), o que indica que mesmo que tenha havido algum dano hepático nos animais tratados com aloxano, esse dano não foi tão grave a ponto de causar aumento das proteínas séricas.

#### Avaliação de função renal

As provas de função renal envolveram a dosagem de ureia e creatinina plasmáticas.

A ureia é uma medida indireta e aproximada da função renal e da taxa de filtração glomerular (se houver função hepática normal). Trata-se também de uma medida da função hepática. A ureia é formada no fígado como produto final do metabolismo e da digestão das proteínas. Durante a digestão, as proteínas são degradadas em aminoácidos. No fígado, esses aminoácidos são catalisados com formação de amônia livre. As moléculas de amônia combinam-se para formar ureia, que é liberada no sangue. A ureia é parcialmente excretada pelos rins. Por conseguinte, a ureia está diretamente relacionada com a função metabólica do fígado e com a função excretora dos rins. Serve como índice da função de ambos os órgãos (HENRY, 1999).

A creatinina é utilizada para estabelecer diagnóstico de comprometimento da função renal. Este teste mede a quantidade de creatinina no sangue. A creatinina é um produto catabólico da creatina-fosfato, que é utilizado na contração do músculo esquelético. A produção diária de creatina e, subsequentemente, de creatinina, depende da massa muscular, que varia muito pouco. A creatinina, da mesma forma que a ureia, é totalmente excretada pelos rins e, portanto, é diretamente proporcional à função excretora renal. Por conseguinte, na presença de função excretora renal normal, os níveis séricos de creatinina devem permanecer constantes e normais (HENRY, 1999).

De acordo com o Gráfico 14 (página 99), os animais diabéticos que receberam apenas veículo (DCN) apresentaram os níveis mais elevados de ureia, porém essa tendência não foi observada para os níveis de creatinina. Portanto, não há uma correlação direta do aumento de ureia plasmática com possíveis danos renais. No entanto, como foi relatado anteriormente, esses mesmos animais (DCN) apresentaram também alteração nos níveis séricos de AST, ALT e fosfatase alcalina (Gráficos 10 e 11, páginas 95 e 96, respectivamente). Sendo assim, a elevação nos níveis plasmáticos de ureia pode estar relacionada a alterações na função metabólica do fígado, corroborando os valores alterados que foram encontrados para as aminotransferase e fosfatase alcalina.

Os animais diabéticos e não diabéticos que foram tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* não apresentaram alterações significativas nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina (Gráfico 14, página 99), evidenciando a ausência de toxicidade renal desse extrato.

## Avaliação de função pancreática

A função pancreática foi avaliada através da dosagem dos níveis séricos de amilase.

A amilase (sinônimo de diastase) é uma enzima digestiva que normalmente atua no espaço extracelular, clivando o amido em pequenos grupos de oligossacarídeos e, finalmente, em monossacarídeos. As glândulas salivares e o pâncreas são as principais fontes orgânicas da amilase. As secreções do pâncreas exócrino incluem enzimas digestivas, como amilase, tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases, desoxirribonuclease e ribonuclease. A inflamação do pâncreas produz a liberação de amilase e de outras enzimas pancreáticas na circulação, muito mais provavelmente pela reabsorção direta através das superfícies peritoneais. Em função de seu baixo peso molecular (50 000 daltons), a amilase é rapidamente eliminada na urina, onde pode permanecer elevada por vários dias devido ao depuramento prolongado, mesmo quando os níveis séricos já se encontram normalizados. A amilase pancreática pode sofrer um aumento agudo no soro após a administração de drogas que promovem a constrição do esfíncter do ducto pancreático (por exemplo, morfina), impedindo, assim, a excreção normal no intestino e permitindo maior absorção da amilase na circulação.

Apesar de a amilase ser um parâmetro de avaliação da função pancreática, não houve alteração nos níveis séricos dessa enzima em nenhum grupo, conforme ilustrado no Gráfico 15 (página 100). Como mencionado acima, o desenvolvimento de processos inflamatórios no pâncreas produz a liberação de amilase na circulação. Tem sido sugerido que o diabetes experimental é resultado de uma inflamação inicial das ilhotas, seguida por uma infiltração de macrófagos ativos e linfócitos nesse foco de inflamação pancreática (SZKUDELSKI, 2001). Em função do seu baixo peso molecular, a amilase liberada durante esse processo inflamatório é rapidamente eliminada na urina, o que explica o fato de não terem sido observadas alterações significativas desse parâmetro.

## Avaliação do perfil lipídico

Para avaliar o perfil lipídico foram dosados os níveis séricos de triglicérides, colesterol total e frações (LDL, VLDL e HDL).

Os triglicérides (TG) identificam o risco de desenvolver coronariopatias. Este teste faz parte do perfil lipídico que inclui a determinação do colesterol e das lipoproteínas. Este teste também é efetuado em pacientes com suspeita de distúrbios do metabolismo das gorduras (HENRY, 1999).

A dosagem do colesterol também é utilizada para estabelecer o risco de coronariopatias. Além disso, é utilizada para a avaliação das hiperlipidemias. O colesterol é o principal lipídio associado à doença vascular arteriosclerótica. Entretanto, o colesterol é necessário para a produção de esteróides, hormônios sexuais, ácidos biliares e membranas celulares. A maior parte ingerida provém de alimentos de origem animal. O fígado metaboliza o colesterol à sua forma livre, e o mesmo é transportado na corrente sanguínea pelas lipoproteínas. Quase 75% do colesterol estão ligados às lipoproteínas de baixa densidade (LDL), enquanto 25% estão ligados às lipoproteínas de alta densidade (HDL). Por conseguinte, o colesterol constitui o principal componente das LDL (“colesterol ruim”) e apenas um componente mínimo das HDL (“colesterol bom”) e das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). AS LDL constituem as lipoproteínas mais diretamente associadas ao risco aumentado de coronariopatias (HENRY, 1999).

O Gráfico 16 (páginas 101) mostram que os animais diabéticos tratados com metformina apresentaram valores mais baixos de triglicérides. De Fronzo e Goodman (1995) e Howlett e Baley (1999) já havia relatado que a administração de metformina em pacientes diabéticos que não respondem à dieta alimentar melhora os controles glicêmico e lipídico.

Os animais diabéticos que foram tratados com extrato não apresentaram alteração nos níveis de triglicérides, colesterol total, LDL e VLDL (Gráficos 16 e 17, páginas 101 e 102, respectivamente). Além disso, foi observado que os valores de HDL foram significativamente maiores que aqueles encontrados para animais diabéticos que receberam apenas veículo. O extrato de *C. pachystachya* parece, portanto, exercer um efeito protetor no desenvolvimento de coronariopatias, já que ele mantém elevados os níveis de HDL, o chamado “colesterol bom”, e em níveis normais os índices de triglicérides, colesterol total, LDL (“colesterol ruim”) e VLDL.

### Parâmetros hematológicos

O hemograma é um exame que analisa as variações quantitativas e morfológicas dos elementos figurados do sangue. A principal informação do hemograma está relacionada à anemia e deficiências particulares com base na morfologia das hemácias e dos leucócitos (WIDMANN, 2002).

O hemograma completo pode ser dividido em três partes: o eritrograma, que estuda as alterações nos eritrócitos, na hemoglobina, no hematócrito, nos índices corpusculares e na morfologia eritrocitária; o leucograma, que estuda a contagem total de leucócitos (leucometria global) e também suas quantidades percentuais e absolutas, além da avaliação de sua morfologia (leucometria específica); e o plaquetograma, que faz a estimativa do número de plaquetas e estuda sua morfologia.

No eritrograma, três variáveis são importantes: a quantidade de hemoglobina presente no sangue total, o volume celular ou hematócrito e o número absoluto de eritrócitos no sangue total, geralmente expresso como milhões de células por microlitro. Índices corpusculares, também denominados índices eritrocitários, são cálculos que permitem a caracterização do tamanho médio e do conteúdo de hemoglobina nos eritrócitos individuais. Esses índices incluem o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração média da hemoglobina corpuscular (CHCM). (WIDMANN, 2002).

A existência de um leucograma elevado na circulação periférica ou nos fluidos corporais é evidência de infecção. Uma contagem diferencial dos leucócitos que revela um “desvio a esquerda” (ou seja, porcentagens anormalmente elevadas de neutrófilos segmentados e bastonetes) é sugestiva de infecção bacteriana, enquanto que um leucograma elevado sem “desvio a esquerda” é indicativo de infecção viral (WIDMANN, 2002).

A única diferença significativa foi observada (Gráficos 18 e 19, páginas 103, 104 e 105, respectivamente) na leucometria global dos animais diabéticos que receberam apenas veículo (DCN), apresentando um número de leucócitos maior que os demais grupos. Essa alteração está relacionada a uma maior propensão de diabéticos ao desenvolvimento de infecções bacterianas, fúngicas ou virais.

## Avaliação histológica

Todos os cortes histológicos observados evidenciaram tecido renal de aspecto habitual. Nos animais diabéticos e não diabéticos observaram-se glomérulos ligeiramente congestionados (Fotografia 3, página 106) e túbulos com estrutura sem alterações patológicas (Fotografia 4, página 107). Essa ligeira congestão pode estar relacionada a um efeito vasodilatador já relatado para espécies do gênero *Cecropia* (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007).

O tecido hepático (Fotografia 5, página 108) mostrou hepatócitos com núcleo e citoplasma sem alterações patológicas em padrão arquitetural, sem anormalidades para todos os grupos, com exceção do grupo DCN. Nesse grupo foram visualizados pontos esbranquiçados no interior dos hepatócitos, que podem corresponder ao acúmulo de gordura ou água. Isso indica o início de uma lesão hepatocelular, corroborando os resultados alterados de aminotransferases e fosfatase alcalina, encontrados para esse grupo.

## 7 CONCLUSÃO

Esse trabalho mostra que o extrato metanólico de *C. pachystachya* possui significativa atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos, não atuando na glicemia de ratos normais. Essa atividade pode ser atribuída, em parte, à presença do ácido clorogênico no extrato.

Atividade antioxidante significativa também foi encontrada utilizando o “método de sequestro de radicais livres - método do DPPH” e “poder de redução”, o que indica que esse extrato possui grande capacidade sequestradora de elétrons, podendo atuar na neutralização de radicais livres, auxiliando no combate ou retardo do desenvolvimento de complicações do diabetes.

Além disso, os resultados da avaliação hematológica e bioquímica revelaram que o extrato metanólico de *C. pachystachya* não apresentou nenhum tipo de toxidez em longo prazo, ou seja, durante os 42 dias de tratamento, o que garante sua biosegurança.

Portanto, o extrato metanólico de *C. pachystachya* necessita de estudos mais aprofundados para avaliar sua atividade e toxicidade em um período de tempo maior, além de uma investigação de seus possíveis mecanismos de ação. Dessa forma, *C. pachystachya* pode se tornar uma planta promissora como auxílio para o tratamento do diabetes melito.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-BARRY, J.A.; ABDEL-HASSAN, I.A.; AL-HAKIEM, M.H.H. 1997. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology** **58 (3)**: 149-155.
- AFIFI, A.F., KHALIL, E., ABDALLA, S. 1999. Effect from isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology** **65 (2)**: 173–177.
- AFONSO-NETO, I.S. 2003. **Atividade moluscicida e repelente de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* d'Orbygni (Gastropoda: Subulinidae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Juiz de Fora, 54 p.
- AGUILAR-BRYAN, L.; CLEMENT IV, J.P.; GONZALEZ, G.; KUNJILWAR, K.; BABENKO, A.; BRYAN, J. 1998. Toward understanding the assembly and structure of K<sub>ATP</sub> channels. **Physiological Reviews**, **78 (1)**: 227-245.
- AIZAWA, T.; SATO, V.; KOMATSUMI, M.; ISHIHARA, F.; TAGUCHI, N.; HASHIZUME, K. 1994. ATP sensitive K<sup>+</sup> channel-independent, glucose-induced signalling in the pancreatic  $\beta$  cell. In: **FLATT, P.R., LENZEN, S. ed. Frontiers of insulin secretion and pancreatic  $\beta$  cell research**. London, Smith-Gordon e Nishimura. p. 167-172
- ALBERT, K.G.M.M.; ZIMMET, P.Z. Consultation, WHO, 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. **Diabetic Medicine**, **15 (7)**: 539-553.
- ALBERTE, J.S.P. 2004. **Diabetes Mellitus tipo 2: significado da doença para os pacientes e suas repercussões para aderência ao tratamento clínico**. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas, SP.
- AL-HABORI, M.; RAMAN, A. 1998. Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of Fenugreek. **Phytotherapy Research** **12 (4)**: 233-242.
- ALI, H.; RAMAN, A.; HOUGHTON, P. J. 2003.  $\alpha$ -Amylase inhibition in Malaysian local plants. **Journal of Pharmacy and Pharmacology, Suplemento** **55**: S 31.

ALMEIDA, R.R., RAIMUNDO, J.M., OLIVEIRA, R.R., KAPLAN, M.A.C., GATTASS, C.R., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G. 2006. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, **33 (1-2)**: 109–113.

ALONSO, J.R. 1998. **Tratado de Fitomedicina Bases clínicas y farmacológicas**. Editorial Isis, Buenos Aires, 258–260.

ALONSO-CASTRO, A.J.; MIRANDA-TORES, A.C.; GONZÁLES-CHÁVEZ, M.M.; SALAZAR-OLIVO, L.A. 2008. *Cecropia obtusifolia* Bertol and its active compound, chlorogenic acid, stimulate 2-NBDglucose uptake in both insulin-sensitive and insulin-resistant 3T3 Adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, **120 (3)**: 458–464.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2005. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care, Suplemento 28**: 37-72.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2008. **All about diabetes** (Online). [acesso 2008 mar 03]. Disponível em <http://diabetes.org/aboutdiabetes.jsp>

AMMON, H.P.T.; WAHL, M.A. 1994. Islet redox rations: their role in insulin release. In: **FLATT, P.R., LENZEN, S. ed. Frontiers of insulin secretion and pancreatic  $\beta$  cell research**. London, Smith-Gordon e Nishimura. p. 113-122.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. 2008. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology** **116 (1)**: 27–32.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ-ZURITA, E.; ORTEGA-LARROCEA, P.; HEINRICH, M. 2006. Disease-Consensus Index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán, México. **Journal of Ethnopharmacology**, **107 (2)**: 199–204.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. 2005. Review: Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, **99 (3)**: 325–348.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **78 (2 – 3)**: 145-149.

ARNAO, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, **11**: 419-421.

ARDUÍNO, F. 1980. **Diabetes**. ARDUÍNO, F. O diabetes ontem e hoje, 3ª edição. Guanabara Koogan, 1-3.

ARGENTINIAN NATIONAL PHARMACOPEIA. 1978. Sixth ed., Buenos Aires, p. 101. ASHCROFT, S.J.; ASHCROFT, F.M. 1992. The sulfonylurea receptor. **Biochimica et Biophysica Acta**, **15 (1)**: 45-59.

AZIZ, N.H., FARAG, S.E., MOUSA, L.A., ABO-ZAID, M.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios, Cambridge**, **93 (374)**: 43-54.

BAILEY, C.J. 1995. Metformin and intestinal glucose handling. **Diabetes Metabolism Reviews**, **11, Suplemento 1**: S23-S32.

BAILEY, C.J. 1999. Insulin resistance and antidiabetic drugs. **Biochemical Pharmacology**, **58 (10)**: 1511-1520.

BAILEY, C.J. 2000. Potential new treatments for type 2 diabetes. **Trends in Pharmacological Sciences**, **21 (7)**: 259-265, 2000.

BAILEY, C.J.; TURNER, R.C. 1996. Metformin. **New England Journal of Medicine**. **334 (9)**: 574-579.

BALKAU, B.; HU, G.; QIAO, Q; TUOMILEHTO, J.; BORCH-JOHNSEN, K.; PYORALA, K. 2004. Prediction of the risk of cardiovascular mortality using a score that includes glucose as a risk factor. **Diabetologia**, **47(12)**: 2118-28.

BARCELÓ, A., AEDO, C. RAJPATHAK, S., ROBLES, S., 2003. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organ** **81 (1)**: 19-27.

BARDET, G. 1908. **Formulaire des Nouveaux Remèdes**, 18th ed. Paris, Octave Doin, Editeur, pp. 236.

BAWDEN, K.; QUANT, J.; RAMAN, A. 2002. Investigation of the inhibitory effects of plant extracts on a starch  $\alpha$ -amylase assay. **Journal of Pharmacy and Pharmacology, Suplemento 54**: S-80.

BAWDEN, K.; QUANT, J.; RAMAN, A. 2003. Fractionation and characterisation of compounds inhibiting  $\alpha$ -amylase and their potential as anti-diabetic remedies. **Journal of Pharmacy and Pharmacology, Suplemento 55**: S 34.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. 2000. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole.  
BAYNES, J.W. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes, 40 (4)**: 405-412.

BERGGREN, P.O.; ARKHAMAR, P.; ISLAM, M.S.I.; JUNTTI-BERGGREN; LIKINDMARK, H.; KOHLER, M.; LARSSON, O.; NILSSON, T.; SZECOWKA, J.; ZHANG, Q. 1994. Molecular mechanism involved in regulating cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  contraction in pancreatic  $\beta$  cells. In: **FLATT, P.R., LENZEN, S. ed. Frontiers of insulin secretion and pancreatic  $\beta$  cell research**. London, Smith-Gordon e Nishimura. p. 201-211.

BORGES, K. B.; BAUTISTA, H. B.; GUILERA, S. 2008. Diabetes – utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia, 5(2)**: 12-20.

BOSCHERO, A. C. 1996. Acoplamento excitação-secreção pelas células  $\beta$  pancreáticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 40**: 149-155.

BOSCHERO, A. C.; CREPALDI-ALVES, S.C.; CARNEIRO, E.M. BOSQUEIRO, J.R. 1998. Canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) e a secreção de insulina: aspectos fisiopatológicos da hiperinsulinemia familiar (HF). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 48 (1)**: 196 – 215.

BRAND, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology, London, 28(1)**: 25-30.

BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews, 56 (11)**: 317-333.

BROWNLEE, M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annual Review of Medicine, 46**: 223-234.

CARREIRA, C.F.S.; BESERRA, N.M.; DINIZ, M.F.F.M.; BATISTA, L.M.; KLUPPEL, B.L.P. 2007. Plantas utilizadas popularmente por diabéticos. **X Encontro de Iniciação a Docência**. Universidade Federal de Pernambuco (UFPB), Pró Reitoria de Graduação (PRG).

CAZAROLLI, L.H. 2004. **Estudo da atividade de flavonóides e de complexos de vanádio na glicemia de ratos diabéticos induzidos com aloxana**. Dissertação de mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 146 p.

COIMBRA, R. 1958. In: **Notas de Fitoterapia. Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia**. 2ª edição, Laboratório Clínico Silva Araújo S.S., Rio de Janeiro, p. 230.

CONSOLINI, A.E., RAGONE, M.I., MIGLIORI, G.N., CONFORTI, P., VOLONTE, M.G. 2006. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, **106 (1)**: 90–96.

CONSOLINI, A.E.; MIGLIORI, G.N. 2005. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats, **Journal of Ethnopharmacology**, **96 (3)**: 417–422.

COSTA, E.C.S. 2005. **Glicogênio cardíaco em diabetes experimental. Efeitos do tratamento com metformina e/ou glibenclamida sobre as funções cardíacas em coração isolado**. Tese de doutorado da Universidade Estadual de Campinas.

CYSNEIROS, R.M. 1996. **Mecanismo da ação hipotensora do extrato aquoso e frações purificadas da *Cecropia glaziovii* Sneth**. Tese de pós-doutorado da Universidade Federal de São Paulo.

CHAILLOU, L.L.; NAZARENO, M.A. 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** **54 (22)**: 8397-8402.

CHEVONIZ, P.L.N. 1927. **Formulário e Guia Médico**. ANDRÉ BLOT, Paris, 330–331.

CHEVOLLEAU, S.; MALLET, J.F.; UCCIANI, E.; GAMISANS, J.; GRUBER, M. 1992. Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, **69**: 1269-1271.

Da SILVA, E.C. 1998. **Modificações das reservas metabólicas em ratos sedentários e treinados tratados com metformina**. Monografia de Graduação da Faculdade de Educação Física da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

DA SILVA, K.; FILHO, V. C. 2002. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, **25(3)**: 449-454.

De MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. 2004. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, **27 (4)**: 586-592.

De SOUSA, E. 2002. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade hipoglicêmica da espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link**. Dissertação de mestrado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. 35 p.

DeFRONZO, R.A.; GOODMAN, A.M. 1995. Efficacy of metformin in patients with non-insulindependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. **New England Journal of Medicine** **333 (9)**: 541-549.

DELARCINA, JR,S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; LAPA, A.J. 2007. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, **14 (5)**: 328–332.

DEVINENI, D.; MCLEOD, F.; PRASAD, P. 1998. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of nateglinide in relation to meal timing in non insulin dependent diabetes mellitus (niddm) subjects. **Diabetes,Suplemento 1**: S 143.  
diabetes: comparison of the two models in rats. **Acta Histochemistry Citochemistry**, **33 (3)**: 201-208.

DOMÍNGUEZ, J.A., SOTO, M. 1925. Monografías farmacológicas argentinas: el ambay. **Trabajos del Instituto de Botánica y Farmacología**, **43**: 1–47.

DUH, P.-D.; YEN, G.-C. 1997. Antioxidative activity of three water extracts. **Food Chemistry**, **60**: 639-645.

DUNN, J.S., SHEEHAN, H.L., MCLETHIE, N.G.B. 1943. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, **1**: 484-487.

EL-ALFY, A.T.; AHMED, A.A.E.; FATANI, A.J. 2005. Protective effect of red seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. 2005. **Pharmacological research**, **52**: 264-270.

ELDER, C. 2004. Ayurveda for diabetes mellitus: a review of the biomedical literature. **Alternative Therapy Health Medicine**, **10(1)**:44-50.

EMILIEN, G.; MALOTEAUX, J.M.; PONCHON, M. 1999. Pharmacological management of diabetes - Recent progress and future perspective in daily drug treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, **81 (1)**: 37-51.

ERNST, E. 1997. Plants with hypoglycemic activity in humans. **Phytomedicine** **4 (1)**: 73-78.

FARAH, A.; DANANGELO, C.M. 2006. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, **18 (1)**: 23-26.

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. 1999. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, **8 (1)**: 17-25.

FERNANDEZ, M.A., SAENZ, M.T., GARCIA, M.D. 1998. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, **50 (10)**: 1183-1186.

FINNEY, D.J. 1971. **Probit Analysis**. 3rd ed. University Press, Cambridge.

FISCHER, L. 1985. Drugs and chemicals that produce diabetes. **Trends in**  
FISHER, J. 1985. Drugs and chemicals that produce diabetes. **Trends in**  
**Pharmacological Sciences** **6**: 72-75.

FISMAN, E.Z.; TENENBAUM, A.; MOTRO, M.; ADLER, Y. 2004. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease. **Herz**, **29 (3)**: 290-298.

GAMACHE, P., RYAN, E., ACWORTH, I.N. 1993. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography**, **635 (1)**: 143-150.

GILBERT A., MICHEL C. 1920. **Formulaire Pratique de Thérapeutique et de Pharmacologie**. 28<sup>a</sup> edição, Paris, Gaston Doin, Éditeur, p. 76.

GIUGLIANO, D.; CERIELLO, A.; PAOLISSO, G. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care** **19 (3)**: 257-267.

GOVIDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A.K.S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **26 (10)**: 1424-1427.

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

GUPTA, S.; KATARIA, M.; GUPTA, P.; MURGANANDAN, S.; YASHROY, R. 2004. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, **90 (2)**: 185-189.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. 1998. **Fisiologia humana e mecanismos da doença**. 6<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 557-577.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S. 1989. Hypoglycemic plants – a review. **Fitoterapia**, **60 (3)**: 195-224.

HARDING, J.J.; BESWICK, H. 1988. The possible contribution of glucose autoxidation to protein modification of diabetes. **Biochemical Journal**, **249 (2)**: 617-619.

HEMMERLE, H., BURGER, H.L., BELOW, P., SCHUBERT, G., RIPPEL, R., SCHINDLER, P.W., PAULUS, E., HERLING, A.W. 1997. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of glucose-6-phosphate translocase. **Journal of Medicinal Chemistry**, **40 (2)**: 137–145.

HENRY, J.B. 1999. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais**. Editora Manole; 19<sup>a</sup> Edição, capítulo 13.

HERMANN, L.S. 1996. In: **Handbook of experimental pharmacology**. In: GOODMAN & GILMAN'S. Ed. by Springer Verlag, 119: 374-407.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M.G.; MORAIS, S.A.L; LONDE, G.B.; NASCIMENTO, E.A; CHANG, R. 2007. Ação alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colonião (*panicum maximum*). **Planta Daninha**, **25 (4)**: 763-769.

HERRERA-ARELLANO, A.; AGUILAR-SANTAMARIA, L.; GRACIA-HERNANDÉZ, B.; NICASIO-TORRES, P.; TORTORIELLO, J. 2004. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. **Phytomedicine**, **11 (7-8)**: 561-566.

HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B. 1998. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology, Supplement 20**: 237-248.

HOWLETT, H.C.S.; BAILEY, C.J. 1999. A risk-benefit assessment of metformin in type 2 diabetes mellitus. **Drug Safety**, **20(6)**: 489-503.

<http://frutasraras.sites.uol.com.br/cecropiapach.htm>. Acesso em 30/01/09.

<http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/am26.htm>. Acesso em 30/01/09.

HUNT, J.V.; SMITH, C.C.T.; WOLFF, S.P. 1990. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. **Diabetes**, **39 (11)**: 1420-1424.

HUO, Y.; WINTERS, W. D.; YAO, DA-LIN. 2003. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytotherapy Research**, **17 (11)**: 48-55.

INAGAKI, N.; GONOI, T.; CLEMENTE, J. P.I.; MANGA, N.; INAZAWA, J.; GONZALES, G.; AGUILAR-BRYAN, L.; SEINO, S.; BRYAN, J. 1995. Reconstitution of I<sub>KATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. **Science**, **270**: 1166-1170.

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

JAHROMI, M. A. F.; RAY, A. B.; CHANSOURIA, J. P. N. 1993. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. **Journal of Natural Products**, **56 (7)**: 989-994.

JOHNS, T.; CHAPMAN, L. 1925. Phytochemicals ingested in traditional diets and medicine as modulators of energy metabolism. In: ARNASON, J. T.; MATA, R.; ROMEO, J. T., (Eds.). **Recent Advances in Phytochemistry**, **29**: 161-188.

JÖRNS, A.; MUNDAY, R.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; 1997. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhidrin to isolated pancreatic islets in vitro. **Journal of Endocrinology**, **155 (2)**: 283-293.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. 1983. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos.

KAHN, C.R. 1985. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Annual Reviews of Medicine**, **36**: 429-451.

KANETO, H.; FUJII, J.; MYINT, T.; MIYAZAWA, N.; ISLAM, K.; KAWASAKI, Y. 1996. Reducing sugars trigger oxidative modifications and apoptosis in pancreatic beta cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. **Biochemical Journal**, **320**: 630-855.

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

KARARA, A.H.; DUNNING, B.E.; McLEOD, J.R. 1999. The effect of food on the oral bioavailability and the pharmacodynamic actions of the insulinotropic agent nateglinide in healthy subjects. **The Journal of Clinical Pharmacology**, **39**: 172-179.

KASUGA, M.; KARLSSON, F. A.; KAHN, C. R. 1982. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science**, **215 (4529)**: 185-187.

KEFAS, B.A.; CAI, Y.; KERCKHOFS, K.; LING, Z.; MARTENS, G.; HEIMBERG, H.; KERRY, N.L., ABBEY, M. 1997. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. **Atherosclerosis**, **135 (1)**: 93-102.

KING, A., YOUNG, G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, **99 (2)**: 213-218.

KING, H., AUBERT, R.E., HERMAN, W.H., 1998. Global burden of diabetes. **Diabetes Care**, **21 (21)**: 1414-1431.

KOBAYASHI, K.; SAITO, Y.; NAKAZAWA, I.; YOSHIZAKI, F. 2000. Screening of crude drugs for influence on amylase activity and postprandial blood glucose in mouse plasma. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **23(10)**: 1250-1253.

KOBAYASHI, Y.; SUZUKI, M.; SATSU, H.; ARAI, S.; HARA, Y.; SUZUKI, K.; MIYAMOTO, Y.; SHIMIZU, M. 2000. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **48 (1111)**: 5618-5623.

KOYA, D.; KING, G.L. 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetes complications. **Diabetes**, **47 (6)**: 859-866.

KPDS GROUP (United Kingdom Prospective Diabetes Study). 1998. Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. **Lancet**, **352(12)**: 854-865.

LACAILLE-DUBOIS, M.A., FRANCK, U., WAGNER, H. 2001. Search for potential angiotensin (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, **8 (1)**: 47-52.

LAMBA, S. S.; BUCH, K.Y.; LEWIS, H.; LAMBA, H. J. 2000. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, **21 (2)**: 457- 495.

LAPA, A.J., LIMA-LANDMAN, M.T.R., CYSNEIROS, R.M., BORGES, A.C.R., SOUCCAR, C., BARRETA, I.P., DE LIMA, T.C.M. 1999. The Brazilian folk medicine program to validate medicinal plants – a topic in new antihypertensive drug research. In: Hostettman, Gupta, Marston (Eds.), **Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the America**; Harwood Acad. Pub., Amsterdam, pp. 185-196.

LARNER, J. in GOODMAN, A.; GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. 1983. **As bases Farmacológicas da Terapêutica**. Guanabara Koogan, 6. Ed. Rio de Janeiro.

LAU, C.; RAMAN, A.; NOEL, M.; KERGOAT, M.; AUTIER, V. 1998. Phytochemicals isolated from the anti-hyperglycaemic hexane extract of the unripe fruit of *Momordica charantia* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology, Supplemento 50**: 84. Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. **Journal of Ethnopharmacology 106 (19)**: 1-28.

LEITER, L.A. 1996. Combination therapy with oral antihyperglycemic agents in the treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus. **Trends Endocrinology and Metabolism**, 216-218.

LENZEN, S.; DRINKGER, J.; TIEDGE, M. 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 20: 463-441.

LENZEN, S. 1992. Glucokinase: signal recognition enzyme for glucose induced insulin-secretion. In: FLATT, R.P., ed. **Nutrient regulation of insulin secretion**. London, Portland. p. 101-124.

LENZEN, S.; PANTEN, U. 1988. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia** 31 (6): 337-342.

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

LETITIA, M.; CUNE, M.C.; TIMOTHY, T. 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous peoples of the North American boreal forest. **Journal of Ethnopharmacology** 82 (2-3): 197-205.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. 2004. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, 92 (1): 1-21.

LIMA-LANDMAN, M.T.R.; BORGES, A.C.R.; CYSNEIROS, R.M.; DE LIMA, T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. 2007. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, 14 (5): 314–320.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. Nova Adessa - SP, 118-119.

MACEDO, C.S.; RIYUZO, M.K.; MERCADANTE, M.C.S.; CAPELETTI, S.M.; HERNADES, D.; SPADELLA, C.T.; BREIM, L.C.; ROSO, S.L.O.; PADOVANI, C.R.; MACEDO, A.R. 1987. Nefropatia diabética em ratos: estudo comparativo entre a diabetes induzida pela aloxana e pela estreptozotocina. Em **Anais da Jornada Brasileira de Nefrologia Peditrícia**; Sociedade Brasileira de Pediatria, Rio de Janeiro, v. 41.

MALAISSSE, W.J. 1992. Regulation of insulin secretion by nutrients: the fuel concept. In: FLATT, R.P., ed. **Nutrient regulation of insulin secretion**. London, Portland. p. 83-100.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. **Phytomedicine**, **2 (2)**: 137-189.

MATOS, F.J.A. 1997. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, EUFC, Fortaleza, Brazil.

MATSCHINSKY, F. M. 1996. Banting Lecture 1995: a lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, **45 (2)**: 223-241.

MATSUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; MATSUMURA, N.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. 1998. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. III.1) Structure-Related Inhibitory Activity and Action Mode of Oleanolic Acid Glycosides on Hypoglycemic Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **46 (9)**: 1399-1403.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M.; 2002. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines. **Pure Applied Chemistry** **74 (7)**: 1301–1308.

McCUNE, L. M.; JOHNS, T. 2002. 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**, **82 (2-3)**: 197-205.

McLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. 1991. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In Atta-Ur Rahman, **Studies in Natural Products Chemistry**, **9**: 383-389.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MACLAUGHLIN, J.L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, **45 (1)**: 31-34.

MIER, S.; KANER, I.; AKIRI, B.; HADAS, S.P. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, **43(7)**: 1813-1817.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN-BEEK, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **Food Chemistry**, **85 (2)**: 231-237.

MUKHERJEE, P.K.; MAITI, K., MUKHERJEE, K.; HOUGHTON, P.J. 2006. Review MURAKAMI, N.; MURAKAMI, T.; KADOYA, M.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. 1996. New hypoglycemic constituents in .gymnemic acid. from *Gymnema sylvestre*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **44 (2)**: 469-471.

NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O., MIRANDA, L.C.G. 1992. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba**, **35 (1)**: 129-138.

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

NEGRI, G. 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **41 (2)**: 121 – 142.

NICASIO, P.; AGUILLAR-SANTAMARIA, L; ARANDA, E.; ORTIZ, S.; GONZALÉZ, M. 2005. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. **Phytotherapy Research**, **19**: 661-664.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X.L.; YAMAGISHI, S.I.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREC, M.A.; BEEBE, D.; OAATES, P.J.; HAMMES, H.P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, **404 (13)**: 787-890.

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

OLIVEIRA, D.M., 2008. **Influência da ingestão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos Wistar**. Dissertação de mestrado em Saúde pública,. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. 1995. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **2(4)**: 137-189.

ONG, K.C.; KHOO, H. 1996. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. **Biochemical Pharmacology**, **51 (4)**: 423-429.

ONG, K.C.; KHOO, H.E. 2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, **67 (14)**: 1695-1705.

ORTEGA, L.N. 2005. **Ocorrência do diabetes mellitus tipo 2 em Presidente Prudente-SP**. Dissertação de mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. Araraquara, SP.

OYAZU, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, **44**: 307-315.

OZUARI, A.; OZTURK, Y.; YILDIZOGLU-ARI, N.; OZCELKAY, A. T.; ALTAN, V. M. 1993. The effects of glyburide and insuline on the cardiac performande in rats with non-insulinedependent diabetes mellitus. **General Pharmacology**, **24(1)**: 165-169.

PATANÈ, G.; PIRO, S.; RABUAZZO, A. M.; ANELLO, M.; VIGNERI, R. 2000. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose. A direct metformin effect pancreatic  $\beta$ -cells. **Diabetes**, **49**: 735-740.

PAULSON, D. 1997. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury. **Cardiovascular Research**. **34 (1)**: 104- 112.

PELEG, H., BODINE, K.K., NOBLE, A.C. 1998. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, **23 (3)**: 371-378.

PEREIRA, N. A. 1997. Plants as hypoglycemic agents. **Ciência e Cultura**, **49 (5-6)**: 354-358.

PEREZ GUTIÉRREZ, R. M. 2002. **Compuestos aislados de plantas com actividad antiinflamatoria, antiviral e hipoglicemiante**. México: Instituto Politécnico Nacional, 139-185.

PEREZ GUTIÉRREZ, R. M.; ZAVALA, S. M. A.; PEREZ, G. S.; PEREZ, G. C. 1998. Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. **Phytomedicine**, **5**: 55-75.

PÉREZ, J.A.M.; PULG, M.L.; YERO, A.H.; 2008. AMADOR, P.A.P. Reguladores prandiales de la glucemia. Enfoque actual. Instituto Nacional de Endocrinología. Centro de Atención al Diabético. **Revista Cubana de Endocrinología**, **12 (1)**: 45 – 57.

PÉREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M.D.; ORTIZ, R. SOTOMAYOR, M.A.; FERNÁNDEZ, M.A. 2001. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, **76 (3)**: 279–284.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, **106 (2)**: 165-169.

PFAFFLY, J.R. 2001. Diabetic complications, hyperglycemia e free radicals. **Free Radicals in Biology and Medicine**, **77**: 222.

PIETTA, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, **63 (7)**: 1035-1042.

RAHMAN, A-U.; ZAMAN, K. 1989. Medicinal plants with hypoglycemic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, **26 (1)**: 1- 55.

RAMALHO, A.C.R. 2002. Insulina e Antidiabéticos Oraís. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6º edição. Guanabara Koogan, 807-825.

RAMOS ALMEIDA, R., MONTANI RAIMUNDO, J., RODRIGUES OLIVEIRA, R., COELHO KAPLAN, M.A., ROCAH GATTASS, C., SUDO, R.T., ZAPATA-SUDO, G. 2006. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in Wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, **33 (1-2)**: 109–113.

REVILLA-MONSALVE, M.C.; ANDRADE-CETTO, A.; PALOMINO-GARIBAY, M.A.; WEDENFELD, H.; ISLAS-ANDRADE, S. 2007. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, **111**: 636-640.

RIBEIRO, J.A. 2008. **Estudos químico e bioquímico do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in natura e processado e influência do seu consumo sobre níveis glicêmicos lipídeos fecais de ratos**. Dissertação de mestrado em Ciências dos Alimentos, Lavras, Minas Gerais. 102 p.

RICCIO, A.; DEL PRATO, S.; KREUTZENBERG, S. V.; TIENGO, A. 1991. Glucose and lipid metabolism in non insulin dependent diabetes. Effect of metformin. **Diabète & Metabolisme**, **17 (1-2)**: 180-184.

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

ROCHA, F.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M.M.; DE LIMA, T.C.M. LAPA, A.J. 2007. Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth and its constituents – In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, **14 (6)**: 396–402.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUÑOZ, J.F. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, **6 (2)**: 1-6.

RORSMAN, P.; BOKVIST, K.; AMMALA, C.; ELIASSON, L. 1994. Ca<sup>2+</sup>-channels, cytoplasmic Ca<sup>2+</sup>-concentration and exocytosis in pancreatic  $\beta$  cells. In: **FLATT, P.R., LENZEN, S. ed. Frontiers of insulin secretion and pancreatic  $\beta$  cell research**. London, Smith-Gordon e Nishimura. p. 187-194.

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

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. 1995. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, **19 (4)**: 481-486.

SALTIEL, A.R.; PESSIN, J.E. **Mechanismo of insulin action**. 2003. Landes Bioscience, Texas. USA.

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

SCARPELLO, J.H.B.; HODGSON, E.; HOWLETT, H.C.S. 1998. Effect of metformin on bile salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, **15 (8)**: 651-6.

SCHMIDT, A.M.; STERN, D. 2000. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. **Trends in Pharmacological Sciences**, **21 (10)**: 367-369.

SILVA, E.M. SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, **101 (3)**: 1012–1018.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 2001. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª edição. Ed. Universidade/UFRGS/Ed UFSC.

SIVORI, P.N. 1933. The carotid sinus and the production of bradycardia by *Cecropia adenopus*, quinidine and harmine. **Revista do Centro de Estudantes de Farmácia e Bioquímica**, **22**: 267–281.

SMITH, T.W. 1992. In CECIL: **Tratado de medicina interna**. 6ª Edição. Ed. Guanabara Koogan, 153 374; 1316-1347.

SOARES, S.E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição, Campinas**, **15(1)**: 71-81.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. 2009. **Diabetes: consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes – CSBD**, 2002 (Online). [acesso2009 fev 14]. Disponível em [http://diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso\\_atual\\_2002.pdf](http://diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso_atual_2002.pdf)

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. 2009. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2007** (Online). [acesso2009 fev 14]. Disponível em <http://diabetes.org.br/politicas/diretrizesonline.php>

SOTO, C.P.; PEREZ, B.L.; FAVARI, L.P.; REYES, J.L. 1998. Prevention of alloxan induced *diabetes mellitus* in the rat by silymarin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **119C**: 125-129.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; TORRES, L.M.B.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. 2008. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, **15 (6-7)**: 462–469.

STUMVOLL, M.; NURJHAN, N.; PERRIELO, G.; DAILEY, G.; GERICH, J. E. 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, **31 (9)**: 550-554.

SUAREZ, G.A.; CLARK, V.M.; NORELL, J.E.; KOTTKE, T.E.; CALLAHAN, M.J.; O'BRIEN, P.C.; LOW, P.A.; DYCK, P.J. 2005. Sudden cardiac death in diabetes mellitus: risk factors in the Rochester diabetic neuropathy study. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**. **76(2)**:240-5.

SUN, X. J.; ROTHENBERG, P.; KAHN, C. R., BACKER, J. M., ARAKI, E.; WILDEN, P. 1991. A. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. **Nature**, **352 (6330)**: 73-77.

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

SZKUDELSKI, T. 2001. Minireview. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**, **50**: 536-546.

TAHARA, A.; YOKONO, A.M.; NAKANO, R.; SOMEYA, Y.; SHIBASAKI, M. 2008. Hypoglycaemic effects of antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic and streptozotocin-induced- severely diabetic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, **103 (6)**: 560 – 568.

TANAE, M.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; DE LIMA T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. 2007. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, **14 (5)**: 309–313.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; BA, G.N.; MATHÉ, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in prevention of human pathologies? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, **56 (4)**: 200-207.

TIMM, L.L. 2005. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas**. Caderno La Salle XI, 2 (1): 231-239.

TIWARI, A. K.; RAO, J. M. 2002. *Diabetes mellitus* and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. **Current Science**, **83 (1)**: 30-38.

TODD, J.A. 1995. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. **Proceedings of the National Academy Sciences**, **92 (19)**: 8560-8565.

UNGER, R.H.; FOSTER, DW. 1998. Diabetes mellitus. In: WILSON, J.D.; FOSTER, D.W. **Textbook of Endocrinology**, 973-1043.

VALSA, A. K.; SUDHEESH, S.; VIJAYALAKSHMI, N. R. 1997. Effect of catechin on carbohydrate metabolism. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, **43**: 406-408.

VARGAS HOWELL, R., ULATE MONTERO, G. 1996. Diuretic effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) on albino rats. **Revista de Biología Tropical**, **44 (1)**: 93-96.  
VASCONCELOS, J.; CASIMIRO, A.B. 1997. Influence of *Azteca alfari* ants on the exploitation of *Cecropia* trees by a leaf-cutting ant. **Biotropica**, **29 (1)**: 84-92.

VELÁZQUEZ, E., TOURNIER, H.A., MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P., SAAVEDRA, G., SCHINELLA, G.R. 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, **74 (1-2)**: 91-97.

VERSPOHL, E.J. 2002. Recommended testing in diabetes research. **Planta Medica**, **68 (7)**: 581-590.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. 2003. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology part C**, **135 (3)**: 357-364.

VIDRIO, H., GARCIA-MARQUEZ, F., REYES, J., SOTO, R.M. 1982. Hypotensive activity of *Cecropia obtusifolia*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **71 (4)**: 475-476.

VIEIRA, J.E.V., MATOS, F.J.A., BARROS, G.S.G., SOUZA, M.P., MEDEIROS, M.C., MEDEIROS, M.J. 1968. Abordagem farmacológica de plantas do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **49**: 67–75.

VILLAR, L.; CASTELLAR, E.; MOURA, E. 1999. **Endocrinologia clínica**. Rio de Janeiro: Medsi.

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

WAJCHENBERG, B.L. 2002. Disfunção endotelial na diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, **46 (5)**: 514-519.

WELSCH, C.A .; LACHANCE, P.A.; WASSERMAN, B.P. 1989. Dietary phenolic compounds: inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. **Journal of Nutrition**, **119 (11)**: 1698-1704.

WANG, Z.; GLEICHMANN, H. 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. **Diabetes** **47**: 50-56.

WHITE, M. F. 1997. The insulin signaling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, **40 (14)**: 2-17.

WIDMANN; SACHER, R.A.; PHERSON, M.C.; MANOLE, R.A. 2001. **Interpretação clínica dos exames laboratoriais**. Editora Manole. 2ª edição; capítulo 11.

WILD, S., ROGLIC, G., GREEN, A., SIRCREEN, R., KING, H., 2004. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, **27 (5)**: 1047-1053.

WOLF, S. 1993. *Diabetes mellitus* and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the etiology of *diabetes mellitus* and complications. **British Medical Bulletin**, **49 (3)**: 642-652.

WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. 1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. **Biochemical Journal**, **245 (1)**: 243-250.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine**: 2005. Disponível em: <http://www.who.int/gb/2005>. Acesso em: 26 de janeiro de 2009.

WRIGHT, C.I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C.I.; KONING, M.M.G. 2007. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, **114 (1)**: 1–31

YIM, H.S.; KANG, S.O.; HAH, Y.C.; CHOCK, P.B.; YIM, M.B. 1995. Free radicals generated during the glycation reaction of amino acids by methylglyoxal. A model study of protein cross-linked free radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, **270 (24)**: 28228-28233.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; HARADA, E.; MURAKAMI, N.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. 1996. Bioactive Saponins and Glycosides. VII.1) On the Hypoglycemic Principles from the Root Cortex of *Aralia elata* SEEM.: Structure Related Hypoglycemic Activity of Oleanolic Acid Oligoglycoside. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **44(10)**:1923-1927.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KADOYA, M.; LI, Y.; MURAKAMI, N.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. 1997a. Medicinal Foodstuffs. IX.1) The Inhibitors of Glucose Absorption from the Leaves of *Gymnema sylvestre* R. Br. (Asclepiadaceae): Structures of Gymnemosides a and b. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **45(10)**: 1671-1676.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, S.; MATSUMURA, N.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; HORI, K.; YAMAHARA, J. 1997b. Medicinal Foodstuffs. VII.1) On the Saponin Constituents with Glucose and Alcohol Absorption-Inhibitory Activity from a Food Garnish .Tomburi., the Fruit of Japanese *Kochia scoparia* (L.) Schrad: Structures of Scopariosides A, B, and C. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **45(8)**: 1300-1305.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. 1998. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. II.1) Aldose Reductase and  $\alpha$ -glucosidase Inhibitors from Brazilian Natural Medicine, the Leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of Myrciacitrins I and II and Myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **46(1)**: 113-119.

ZARZUELO, A.; JIMÉNEZ, I.; GÁMEZ, M.J.; UTRILLA, P.; FERNÁNDEZ, I.; TORRES, M.I.; OSUNA, I. 1996. Effects of luteolin 5-O- $\beta$ -rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, **58 (25)**: 2311-2316.

ZHANG, H.; OLLINGER, K.; BRUNK, U. 1995. Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. **Diabetologia**, **38 (6)**: 635-641.

ZHAO, L. 2001. Effects of free radicals in diabetes. **Free Radicals in Biology and Medicine**, **77**: 222.

ZECCHIN, H. G.; CARVALHEIRA, J. B.; SAAD, M. J. 2004. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, **14(4)**: 574-589.

**ANEXO A - Artigo submetido na revista Phytomedicine, intitulado Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats**

Elsevier Editorial System(tm) for Phytomedicine

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats

Article Type: Original Article

Keywords: *Cecropia pachystachya*; diabetes; hypoglycemic; antioxidant

Corresponding Author: Dr Elita Scio, PhD

Corresponding Author's Institution: Federal University of Juiz de Fora

First Author: Danielle O Aragão, MS student

Order of Authors: Danielle O Aragão, MS student; Lyvia G Nogueira, MS student; Juliana Lanini, MS student; Juliana C Costa, undergraduate student; Raul G Garcia, Dr; Elita Scio, PhD

**Abstract**

*Diabetes mellitus* is a syndrome that affects more than 180 million of people around the world and the number is likely to more than double by 2030. The prime clinical characteristic of diabetes is the hyperglycemia. Several works show that hyperglycemia is critical on diabetic complication development and that these effects are associated to oxidative stress. In this regard, this study investigate the hypoglycemic effect of the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* in normal, glucose loading and alloxan-induced diabetic rats. The extract presented a pronounced decrease of the blood glucose levels of diabetic rats. This effect was not observed for normal rats. This extract also presented relevant antioxidant activity (DPPH and reduction power). A preliminary phytochemical screening revealed the presence of phenols, flavonoids, coumarins, tannins, steroids, anthraquinones and alkaloids. Chlorogenic acid was also identified in the extract. The findings show that *C. pachystachya* possesses a powerful hypoglycemic and antioxidant activity indicating that it is a promising plant species for handling of diabetes.

Key words: *Cecropia pachystachya*; diabetes; hypoglycemic; antioxidant.

## Introduction

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia and alterations in carbohydrate, lipid and protein metabolism, associated with absolute or relative deficiencies in insulin secretion and/or insulin action (Valiathan, 1998). The World Health Organization (WHO) estimates that more than 180 million people worldwide have diabetes. This number is likely to more than double by 2030 (WHO 2008) and that of Brazil will increase from more than 8 million in 2005 to more 12 million in 2030 (SBD 2007). The high prevalence of diabetes as well as its long-term complications has led to an ongoing search for hypoglycemic agents from natural sources (Aларcon-Aguilar et al. 1997).

Some species from the genus *Cecropia* (Moraceae) are popularly used in Brazil to treat diabetes. Those are native to Central and South America and are known as embauba (Lorenzi and Matos 2002). Leaves and bark of *Cecropia pachystachya* Trecul are described in the folk medicine as possessing antitusive, expectorant and antiasthmatic effects (Soraru and Bandoni 1978). The hexane extract of the leaves exhibited a significant anti-inflammatory effect and sitosterol was the only isolated compound with a significantly high anti-inflammatory activity (Hikawczuk et al. 1998).

Hypotensive effect was also described (Consolini and Migliori 2005) but to the best of our knowledge, no report is available about its hypoglycemic activity.

## Materials and Methods

### Plant material

The leaves of *C. pachystachya* were collected in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, in November, 2004 (spring season). The plant material was identified by Dr. Ricardo Montanele de Castro of the University of Feira de Santana, BA, Brazil. A voucher specimen (CESJ 46591) has been deposited at the Herbarium Leopoldo Krieger of the Federal University of Juiz de Fora.

### Preparation of plant extract

The dried leaves (60 g) were powdered and macerated with methanol (3 x 200 ml) for five days at room temperature. The extract was then concentrated using a rotatory evaporator under reduced pressure (yield 26 g), and kept in tightly stoppered bottle under refrigeration until used for the biological testing and phytochemical screening.

### Experimental animals

Male Wistar rats of 60 days in age, weighing 160 – 200 g, obtained from the Reproduction Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora, were housed in a room kept under controlled conditions with temperature maintained at 23 °C ± 2°C, on a 12h light: 12h dark cycle and free access to water and complete commercial chow (Nuvital™, Colombo, PR, BR).

## Induction of experimental diabetes

Diabetes was induced by a single intravenous injection of 80 mg/kg b.w. of alloxan monohydrate (Sigma, St. Louis, MO, USA) dissolved in sterile normal saline (NaCl 0.9%) in overnight fasted rats. Diabetes was identified by measuring fasting plasma glucose levels 7 days after alloxan injection. Animals with plasma glucose levels > 200mg/dl were selected and used for this study.

## Preparation of test sample

The extract, and the standard hypoglycemic drugs Glibenclamide (Embrafarma<sup>®</sup>) and Metformin (Galena<sup>®</sup>) were suspended in isotonic saline solution (NaCl 0.9%) with 3% DMSO and was administered orally, after an overnight fast, at a single dose of 400 mg/kg, 3 mg/kg and 120 mg/kg b.w., respectively, keeping the volume of the vehicle constant at 1 ml.

## Oral glucose tolerance test (OGTT)

After acclimatization, rats were divided into six experimental groups ( $n = 6$ ): Group I, diabetic rats administered with *C. pachystachya* methanolic extract; group II, diabetic rats received vehicle (NaCl 0.9%); group III, diabetic rats received glibenclamide; group IV, diabetic rats received metformin; group V, normal rats received *C. pachystachya* methanolic extract and group VI, normal rats received vehicle. Normal and diabetic rats fasted overnight received glucose (2 g/kg b.w.) 30 min before the administration of the extract, the vehicle and the standard drugs. Blood samples were collected from the tail vein before the administration of glucose and at 30 min, 1, 2, 6, 4, 6, 8, 10 and 12 h later. Blood glucose levels were measured using clinical glucometer (Accu-Check Active<sup>®</sup>, Roche).

## Acute hypoglycemic effect

After acclimatization, rats previously fasted for 12 h were divided into six experimental groups ( $n = 6$ ): Group I, diabetic rats received vehicle (NaCl 0.9%); group II, diabetic rats received *C. pachystachya* methanolic extract; group III, diabetic rats received glibenclamide; group IV, diabetic rats received metformine; group V, normal rats received *C. pachystachya* methanolic extract and group VI, normal rats received vehicle. Blood samples were taken from the tail vein just before treatment (time 0) and 30, 60, 90 and 120 min later.

## DPPH assay

The free radical scavenging activity of the extract of *C. pachystachya* and standard  $\alpha$ -tocopherol (Sigma, St. Louis, MO, USA) solutions in methanol was determined based on their ability to react with stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical (Sigma) (Govidarajan et al., 2003). The antioxidant activity of the samples was expressed as IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration), which was defined as the concentration (in  $\mu\text{g/ml}$ ) of sample required to inhibit the formation of DPPH radicals by 50%. Quercetin and rutin were used as positive control.

### **Reducing power**

The reducing power was determined by the method of Oyaku (1986). Ascorbic acid was used as reference material. EC<sub>50</sub> (effective concentration) values ( $\mu\text{g/ml}$ ) were calculated and indicates the effective concentration at which the absorbance was 0.5 for reducing power.

### **Cytotoxicity assay**

Brine shrimp lethality bioassay (Meyer et al. 1982) was carried out to investigate the cytotoxicity of the extract. Both positive (thymol) and negative (sea water containing 1% DMSO) control assays were carried out in order to verify the susceptibility of *A. salina* under assay conditions employed.

### **Phytochemical screening**

A portion of the extract that was subjected to biological screening was used for the identification of the major secondary metabolites employing the protocols described by Matos (1997).

### **Amount of total phenolic compounds and flavonoids**

The amount of phenolic compounds in the extract was determined by the Folin-Denis method (Duh and Yen 1997). Tannic acid was used as the standard for the calibration curve. Total content of the phenolic compounds was expressed in mg/g extract, in tannic acid equivalents (TAE).

The amount of flavonoids was determined as previously described by Miliauskas et al. (2004) with slight modifications. Rutin was used as the standard for the calibration curve. Total amount of flavonoids was expressed in mg/g extract, in rutin equivalents (RE).

### **HPLC analysis**

Liquid chromatography was performed using an Agilent 1200 machine. The sample was applied using an automatic injector and separated on a Zorbax SB-C18 column, 250 x 4.6 mm at 25 °C. The mobile phase was a linear gradient of solvent A (acetonitrile: H<sub>2</sub>O, 5:95, v/v, pH 4.0 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) and B (acetonitrile: H<sub>2</sub>O, 90:10, v/v, pH 4.0 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) varying from 0% - 100% of B in 30 min. The flow rate was 1ml/min and for detection a DAD was used.

### **Statistical analysis**

Values are presented as means  $\pm$  SEM. Statistical differences between the treatments and the controls were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test using the "GraphPad Prism 4" statistic computer program. A difference in the mean values of  $P < 0.01$  was considered to be statistically significant. The IC<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> value at 95% confidence interval for antioxidant activity and reducing power, respectively, were calculated using a linear regression curve.

## Results and Discussion

Results of the glucose tolerance test are shown in Fig. 1. Basal glycemia remained high in the diabetic control group, whereas glibenclamide and metformine caused a reduction of blood glucose (77 and 84%  $P < 0.01$ , respectively) after 12 hours. In diabetic rats, the extract of *C. pachystachya* caused a significant hypoglycemic effect throughout the period studied, reaching glycemic levels below 116 mg/ml after 12 hours with a blood glucose reduction of 67,5% ( $P < 0.01$ ), when compared to the respective zero time. The glucose levels found for these rats were statistically equal to that of glibenclamide. Metformine showed a higher hypoglycemic effect. By the other hand, no significant difference in blood glucose levels was observed for the normal rats treated with the extract when compared to zero time of this group (Fig. 1). The decrease in blood glucose levels in both normal extract treated rats and control groups shown in Fig.1 may be due to the natural decrease in glucose levels caused by the no ingestion of food throughout the period studied.

The acute effect of the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* was also evaluated. The administration of the extract in alloxan-induced diabetic rats produced a significant reduction in the blood glucose levels at all points tested when compared to zero time (Fig. 2). The effect was more pronounced at 90 min (reduction of 60%,  $P < 0.01$ ). After 120 min, no significant difference was observed between the blood levels of the rats treated with the extract and those treated with the standard drugs (metformine and glibenclamide). The extract had no effect on the glucose levels of normal rats when compared to 0 h of their respective group. Fig 1

Alloxan causes a massive reduction in insulin release by the destruction of the  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans inducing hyperglycemia, and their effects are irreversible (Fisher, 1985). In the present study, the dose of alloxan (80 mg/kg, i.p.) was selected in order to partially destroy the pancreatic  $\beta$ -cells. In these conditions, insulin was secreted but not sufficiently to regulate the blood glucose (Sy *et al.* 2005). The administration of alloxan to the fasted rats markedly increased blood glucose levels as comparable to both groups I in Fig. 1 and 2. Also, in these groups, the vehicle did not show a significant difference in blood glucose levels.

The possible mechanisms by which *C. pachystachya* extract brings about its hypoglycemic action may be potentiation of the insulin effect of plasma. It is also conceivable that the hypoglycemic principles in this extract exert their effect by an extrapancreatic mechanism in rats (Almeida 2006). In this context a number of other plants have also been observed to have hypoglycemic and insulin-release stimulatory effects (Twajj and Al-Badr 1998; Gupta 1994).

Further studies focusing the mechanism of action are required. Since diabetes is a chronic disorder requiring long-term therapy, also there is a need to assess the hypoglycemic/anti-hyperglycemic effect of the extract for a longer duration.

Another species of this genus, *C. obtusifolia*, had also been reported to have hypoglycemic effects. Its leaves aqueous extract showed significant hypoglycemic activity when tested in mice and rats, and a hot water extract given to rabbits and dogs elicited the same blood sugar-lowering effect. Also, the methanol leaves extract of *C. peltata* demonstrated hypoglycemic effects in healthy mice (Nicasio *et al.* 2005). This effect is attributed, in part, to chlorogenic acid contents in both species which, when tested individually, also demonstrated hypoglycemic activity in rats. The HPLC profile of the extract of *C. pachystachya* also showed the presence of this compound (Fig. 3), and probably it was contributing for the hypoglycemic effect observed in this study.

Chlorogenic acid was identified as a specific inhibitor of the glucose-6-phosphate translocase component (G1-6-P translocase) in microsomes of rat liver. Simultaneous targeting of gluconeogenesis and glycogenolysis with an inhibitor of G1-6-P translocase would result in a reduction of hepatic glucose production (Hemmerle et al. 1997). Also the flavonoid isoorientin were isolated from the butanolic extract of *C. obtusifolia* (Andrade-Cetto and Wiedenfeld 2001). In diabetic patients, isoorientin decreases the circulating of radical scavengers, and reduces symptoms of associated complications. However, the hypoglycemic effect of this compound has not yet been tested (Andrade- Cetto 2005).

The phytochemical screening of *C. pachystachya* revealed the presence of flavonoids, tannins, sterols/triterpenoids, alkaloids, tannins and anthocyanins. The content of flavonoids was 83 mg/g plant expressed as rutin equivalents and that of total phenolics was 326 mg/g plant expressed as tannic acid equivalents. Some flavonoids, sterols/triterpenoids, alkaloids and phenolic acids are known to be bioactive antidiabetic principles (Ivorra et al. 1989). Also, flavonoids and other polyphenols are able to act as antioxidants as they have the ability to scavenge free radicals (Chaillou and Nazareno 2006).

Relatively stable DPPH radical has been widely used to test the ability of compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors and thus to evaluate the antioxidant activity (Kanatt et al. 2007). The DPPH radical scavenging activity of the extract of *C. pachystachya* was pronounced with IC<sub>50</sub> of 3.1 (2.0 – 4.5) µg/ml. The IC<sub>50</sub> is the concentration at which 50% scavenging of the free radical is obtained. The value found was compared with the pure flavonoids rutin and quercetin which showed IC<sub>50</sub> 2.5 (2.1 – 3.0) µg/ml and IC<sub>50</sub> 0.98 (0.5 – 1.9) µg/ml, respectively. Antioxidant activity had also been reported to be concomitant with the development of reducing power (Wang et al. 2006). Actually, the extract of *C. pachystachya* presented a significant ability of reduction power (EC<sub>50</sub> of 10.8 ± 0.65 µg/ml) when compared to ascorbic acid (EC<sub>50</sub> of 25.2 ± 0.51 µg/ml). The reducing capacity of a compound may serve as a significant indicator of its potential antioxidant activity (Mier et al. 1995). Okuda et al. (1983) reported that the reducing power of some compounds, like tannins prevents liver injury by inhibiting the formation of lipid peroxides.

The antioxidant effect of plants used in diabetes treatment had been demonstrated by Letitia et al. (2002). According to these authors, the benefit of antioxidants in the prevention of the complications of diabetes supports and validates the use of the traditional medicine. Antioxidants are important in preventing diabetes, with low levels of plasma antioxidants implicated as a risk factor for the development of the disease, while throughout the progression of diabetes high levels of circulating radical scavengers have been recorded.

Although the methanol extract of *C. pachystachya* demonstrated a very significant antioxidant, the hypoglycemic effect presented after the administration of the extract could probably not protect or recover the oxidative damage induced by alloxan.

The methanol extract of *C. pachystachya* did not exhibited cytotoxic activity against *Artemia salina* as the LC<sub>50</sub> was greater than 250 µg/ml. Only LC<sub>50</sub> values < 250µg/ml are considered significant for crude extracts (Rieser et al. 1996). The brine shrimp lethality assay is based on the ability to kill laboratory-cultured *Artemia salina* nauplii brine shrimp. The brine shrimp lethality assay is considered to be one of the most useful tool for the preliminary assessment of general toxicity (McLaughlin et al. 1991). In conclusion, we provided the first report on hypoglycemic and antioxidant effects of methanol extract of *C. pachystachya* leaves. Further studies will be focused on

determination of the mechanism(s) of action, as well as on the isolation of bioactive principles and long term experiments.

### Acknowledgement

The authors are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and to Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) for financial support, to Dr Ricardo Montanele de Castro for the botanical identification of the species, to the Center of the Biology of Reproduction of the Federal University of Juiz de Fora for providing the rats.

### References

- Alarcon-Aguilar, F.J., Roman-Ramos, R., Jimenez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R., Gonzales-Paredes, B., Flores-Saenz, J.L., 1997. Effects of three Mexican medicinal plants (Asteraceae) on blood glucose levels in healthy mice and rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 55, 171-177.
- Almeida, E.R., Guedes, M.C., Albuquerque, J.F.C., Xavier, H., 2006. Hypoglycemic effect of *Bauhinia Cheilandra* in rats. *Fitoterapia* 77, 276-278.
- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J. Ethnopharmacol* 78, 145-149.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol* 99, 325-348.
- Chaillou, L.L., Nazareno, M.A., 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J. Agr. Food Chem.* 54, 8397-8402.
- Consolini, A.E., Migliori, G.N., 2005. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *J. Etnopharmacol.* 96, 417-422.
- Duh, P.D., Yen, G.C., 1997. Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chem.* 60, 639-645.
- Fisher, J., 1985. Drugs and chemicals that produce diabetes. *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 72-75.
- Govidarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P., 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1424-1427.
- Gupta, M.P., Solis, N.G., Avella, M.E., Sanchez, C., 1984. Hypoglycemic activity of *Neurolena lobata*. *J. Ethnopharmacol.* 10, 323-327.

- Hikawczuk, V.J., Saad, J.R., Guardia, T., Juarez, A.O., Giordano, O.S., 1998. Antiinflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia packystachya*. *Anales de la Asociación Química Argentina* 86, 167-170.
- Ivorra, M.D., Paya, M., Villar, A., 1989. A review of natural products and plants as potent antidiabetic drugs. *J. Ethnopharmacol.* 27, 243-275.
- Kanatt, S.R., Chandder, R., Sharma, A., 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* 100, 451-458.
- Letitia, M., Cune, Mc., Timothy, T., 2002. Antioxidant activity in medicinal plant associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous peoples of the North American boreal forest. *J. Ethnopharmacol.* 82, 197-205.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais do Brasil*. Nova Odessa. Instituto Plantarum, São Paulo.
- Matos, F.J.A., 1997. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. UFC Ed., Fortaleza, Brazil.
- McLaughlin, J.L., Chang, C.J., Smith, D.L., 1991. Bench-top bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Atta-Ur Rahman (Ed), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol 9. Pergamon Press, London, pp. 383-389.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., MacLaughlin, J.L., 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45, 31-34.
- Mier, S., Kaner, I., Akiri, B., Hadas, S.P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agr. Food Chem.* 43, 1813-1817.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 85, 231-237.
- Nicasio, P., Santamaría, L.A., Aranda, E., Ortiz, S., González, M., 2005. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. *Phytother. Res.* 19, 661-664.
- Okuda, T., 2005. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry* 66, 2012-2031.
- Oyaku, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307-315.
- Rieser, M.J., Gu, Z.M., Frang, I., Wood, K.V., McLaughlin, J.L., 1996. Five novel monotetrahydrofuran ring acetogenins from seeds of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 59, 100-108.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), 2007. Tratamento e Acompanhamento do *Diabetes mellitus* – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.

Soraru, S.B., Bandoni, A.L., 1978. Plantas de la medicina popular argentina. Editorial Albatros, Buenos Aires.

Sy, G.Y., Cissé, A., Nongonierma, R.B., Sarr, M., Mbodj, N.A., Faye, B., 2005. Hypoglycaemic and antidiabetic activity of acetonic extract of *Vernonia colorata* leaves in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 98, 171-175.

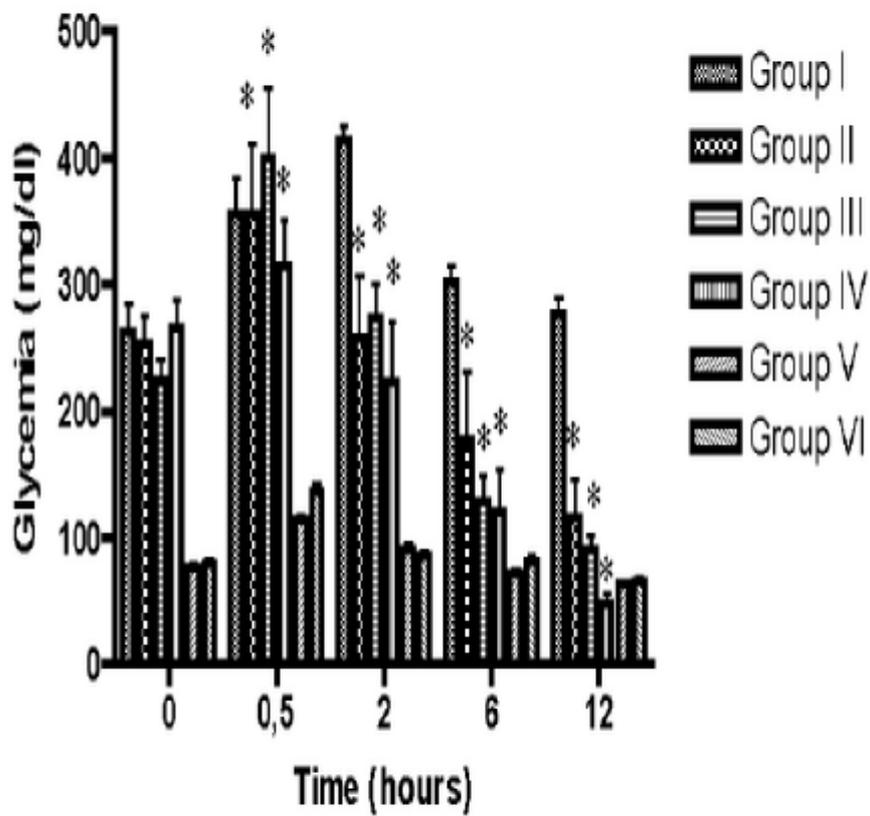
Twaij, H.A.A.A., Al-Badr, A.A., 1998. Hypoglycemic activity of *Artemisia herba Alba*. J. Ethnopharmacol. 24, 123-126.

Valiathan, M.S., 1998. Healing plants. Curr. Sci. 75, 1122-1127.

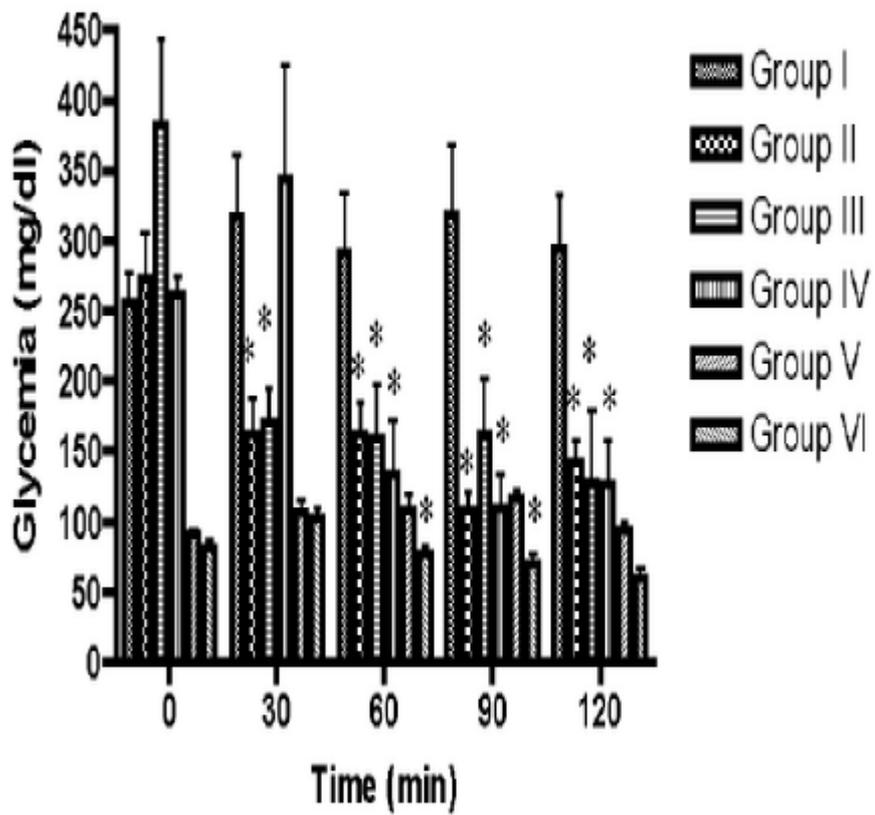
WHO expert committee on Diabetes mellitus, 2008. Technical reports series World Health Organization, Geneva.

## Legends

**Fig. 1.** Effect of the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* on oral glucose tolerance in normal and diabetic rats. Data represent the mean  $\pm$  SEM of six rats. \*  $P < 0.01$ .



**Fig. 2.** Acute effect of the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* in normal and diabetic rats. Data represent the mean  $\pm$  SEM of six rats. \*  $P < 0.01$ .



**Fig. 3.** HPLC chromatogram of the methanolic extract of the leaves of *C. pachystachya* at 230 nm. Peak 1: Chlorogenic acid. Detail: UV spectrum of chlorogenic acid.

