

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Danielle Maria de Oliveira Aragão

***Cecropia pachystachya* Trécul como adjuvante no tratamento do
diabetes melito**

Juiz de Fora
2015

UFJF	Danielle Maria de Oliveira Aragão <i>Cecropia</i> <i>pachystachya</i> Trécul como adjuvante no tratamento do diabetes melito	2015
------	--	-------------

DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO

***Cecropia pachystachya* Trécul COMO ADJUVANTE NO
TRATAMENTO DO DIABETES MELITO**

Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elita Scio Fontes

Juiz de Fora
2015

DANIELLE MARIA DE OLIVEIRA ARAGÃO

***Cecropia pachystachya* Trécul no tratamento dos sintomas do diabetes melito**

Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elita Scio Fontes

EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Elita Scio Fontes
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Profª Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes
(Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG)

Profª Dra. Silvia Passos Andrade
(Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG)

Prof. Dr. Leonardo Meneghin Mendonça
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

Profª Dra. Ana Eliza Andreazzi
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Charles Darwin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dário e Brígida, que me proporcionaram uma educação de qualidade sem medir esforços e sempre apoiaram, incondicionalmente, todas as minhas decisões profissionais

AGRADECIMENTOS

Em Novembro do ano 2000, em uma aula de língua Portuguesa, a professora Mariângela L. Guedes, em mais uma de nossas conversas sob o cotidiano, esclarecia-nos sob nossas escolhas quanto ao futuro profissional. Ela dizia que o verdadeiro DOUTOR era aquele indivíduo que fazia um curso de pós graduação e obtinha o título correspondente a esse nível de escolaridade. Na mesma época, em mais um passeio dominical, após sair da casa dos meus avós, ao passar pela Universidade Federal de Juiz de Fora, minha mãe repetia sua célebre frase “Olha lá sua faculdade, minha filha, são 79 vagas para o curso de Farmácia e Bioquímica, porque uma já é sua!”. E eu, respondia, “Se Deus quiser! Assim será e de lá não mais eu sairei!”. O que para muitos parecia um sonho, apenas um ideal, tornou-se realidade ainda naquele ano. E aqui estou eu, verdadeiramente DOUTORA. Tenho a certeza de que nada disso faria sentido e seria concluído se não fosse a grande obra de Deus que colocou verdadeiros anjos no meu caminho desde o princípio da minha existência. Por isso, o meu muito obrigada:

A Deus, por tudo

À minha orientadora Elita, por acreditar em mim desde o primeiro encontro e por todo o apoio científico e profissional

À professora Ana Cláudia, por todo aprendizado na carreira docente e apoio pessoal
Aos professores do Departamento de Bioquímica da UFJF, Amauriy Jair, Antônia, Everton, Noemides, Valquíria, Walquíria, Rodrigo, Priscila, Eveline pela oportunidade de aprendizado

Ao Delfino, por todo o apoio técnico e pessoal

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica da UFJF, pelo apoio

À professora Christina Castanõn, do Departamento de Morfologia da UFJF, pelo apoio na confecção e análise das lâminas histológicas

Ao professor José de Jesus Ribeiro Gomes de Pinho, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FFB/UFJF, pelo auxílio no desenvolvimento da formulação farmacêutica

À professora Ana Eliza Andreazzi, pelo apoio na dosagem de insulina e na análise e discussão dos resultados

A todos os membros externos e internos da banca examinadora por aceitarem o convite e se disporem a acrescentar ainda mais a esse trabalho. O meu muito obrigada às professoras Elaine, Silvia, Ana Eliza e ao professor Leonardo

À Maria Fernanda e Carol, pela dedicação integral ao trabalho e apoio imprescindível à conclusão de todo esse trabalho

Ao Rodrigo, pelo auxílio imprescindível na análise quantitativa dos extratos e por todo o apoio desde a graduação

À Marina e Melina, pelo apoio para a conclusão desse trabalho

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, pelos auxílios diversos ao longo desse trabalho

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, pelo suporte técnico e teórico

Ao Centro de Biologia da Reprodução (CBR) pelo fornecimento de animais e suprimentos

À FAPEMIG, CAPES e CNPQ, pelo suporte financeiro

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo suporte técnico

Aos meus pais Dário e Brígida, pelo apoio incondicional e sem medidas

À Débora, minha irmã, pela ajuda em qualquer momento e a qualquer hora e por me dar meu melhor presente, minha sobrinha e afilhada Sophia, alegria e suavidade dos meus dias

Ao meu grande Amor Arthur, pela amizade, compreensão e espera por todo esse tempo de dedicação e estudo, e por tornar minha vida mais simples

À minha cunhada Nicolly, por toda torcida e por me apresentar meu grande Amor Arthur

A todos os meus familiares, em especial meu padrinho Tio Robinho, pelo interesse e pela torcida por todo esse trabalho

Aos meus anjinhos, vó Vanda, vô José e vô Dário, pelo “apoio a longa distância”

Às amigas do quarteto fantástico, Carol, Ana Carol e Denise, pela compreensão em todas as minhas ausências

E a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse ideal

RESUMO

Diabetes melito engloba uma série de alterações metabólicas que acarretam um estado crônico de hiperglicemia. Buscando novas alternativas para seu tratamento, muitas espécies de plantas conhecidas na medicina popular pelas propriedades hipoglicemiantes têm sido avaliadas. Entre essas espécies está *Cecropia pachystachya* Trécul (URTICACEAE), uma planta nativa do Brasil, cujos nomes populares são embaúba, imbaíba, umbaúba, árvore-de-preguiça, barbeira, torém. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial hipoglicemiante, antioxidante e toxicológico das folhas de *Cecropia pachystachya*. Inicialmente foram preparados dois extratos das folhas dessa espécie, metanólico (EM) e em acetato de etila (EAE). Ambos os extratos foram submetidos à análise quantitativa dos marcadores moleculares e, posteriormente, foi avaliado o efeito hipoglicemiante de cada um deles. EAE foi incorporado a uma formulação farmacêutica líquida (FF). EM, EAE e FF foram utilizados para o tratamento de ratos da linhagem Wistar normais e induzidos ao diabetes por estreptozotocina. A evolução desses tratamentos foi avaliada através de medidas mensais de glicemias de jejum, além de acompanhamento de peso corporal e consumos de água e ração. Ao final de seis meses, os animais foram eutanasiados e amostras de sangue e órgãos foram coletadas para análises bioquímicas, antioxidante e histopatológica. Foram ainda avaliados os efeitos de FF após a interrupção do tratamento e o efeito do pré-tratamento com FF na indução de ratos com estreptozocina. A análise do perfil cromatográfico de EM e EAE revelou a presença de três marcadores moleculares, ácido clorogênico, isoorientina e orientina. Na análise quantitativa foram observados maiores teores dos flavonoides isoorientina e orientina em EAE. Os extratos padronizados foram administrados em ratos diabéticos ao longo de seis meses, mostrando reduções significativas tanto para EM (56%) quanto para EAE (69%). No entanto, EAE apresentou redução significativa da glicemia já no primeiro mês de tratamento, além de apresentar resultados relevantes em todos os parâmetros antioxidantes avaliados. O tratamento crônico com FF proporcionou uma redução de aproximadamente 70% da glicemia de jejum, ao final dos seis meses, em relação à glicemia inicial desses mesmos animais. Após a interrupção desse tratamento, as glicemias de animais diabéticos foram mantidas em níveis normais. Além disso, o pré-tratamento de ratos normais com FF promoveu proteção sobre as células B-pancreáticas durante a indução do diabetes utilizando estreptozocina. Os resultados mostraram que a FF desenvolvida a partir da espécie *Cecropia pachystachya* pode ser indicada na preparação de um fitoterápico para auxiliar no tratamento do diabetes melito.

Palavras-chave: Extrato em acetato de etila, extrato metanólico, formulação farmacêutica líquida, hipoglicemiante, uso oral.

ABSTRACT

Diabetes mellitus comprises a series of metabolic changes that lead to a chronic state of hyperglycemia. Seeking new alternatives for their treatment, many species of plants known in folk medicine for hypoglycemic properties have been evaluated. Among these species is *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae), a plant native to Brazil, whose common names are embaúba, imbaíba, umbaúba, tree-of-laziness, barbeira, Torem. In this context, the present study aimed to evaluate the potential hypoglycemic, antioxidant and toxicology of *Cecropia* leaves *pachystachya*. Initially were prepared two extracts from the leaves of this species, methanol (EM) and ethyl acetate (EAE). Both extracts were subjected to quantitative analysis of molecular markers and subsequently evaluated the hypoglycemic effect of each. EAE was incorporated into a liquid pharmaceutical formulation (FF). MS, EAE and FF were used for the treatment of normal Wistar rats and streptozotocin-induced diabetes. The evolution of these treatments was evaluated through monthly measurements of fasting glucose, and body weight monitoring and water and feed consumption. After six months, the animals were euthanized and blood samples and organs were collected for biochemical, antioxidant and histopathological analysis. We also assessed the effects of FF after discontinuation of treatment and the effect of pretreatment with inducing FF in rats with streptozocin. Analysis of the chromatographic profile of MS and EAE showed the presence of three molecular markers, chlorogenic, orientin and isoorientina acid. The quantitative analysis showed higher levels of flavonoids orientin isoorientina and in EAE. Standardized extracts were administered to diabetic rats over six months, showing significant reductions for both MS (56%) and against EAE (69%). However, EAE had a significant reduction of blood glucose in the first month of treatment, and provide relevant results in all evaluated parameters antioxidants. Chronic treatment with FF was reduced by approximately 70% of fasting glucose at the end of six months from the initial blood glucose of those animals. After discontinuation of treatment, the glycemia of diabetic animals were maintained at normal levels. In addition, pretreatment of mice with normal FF provided protection for pancreatic B-cells in diabetes induced using streptozotocin. The results show that FF developed from *Cecropia pachystachya* species can be indicated in a herbal preparation to aid in the treatment of diabetes mellitus.

Keywords: *Extract in ethyl acetate, methanolic extract, liquid pharmaceutical formulation, hypoglycemic, oral use.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 – Árvore de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	61
Figura 2 – Folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	62
Figura 3 – Estrutura química do ácido clorogênico	65
Figura 4 – Estrutura do flavonoide glicosilado isoorientina	66
Figura 5 – Esquema de preparo dos extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i>	78
Figura 6 – Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i>	105
Figura 7 – Fotomicrografias histológicas de cortes pancreáticos	119
Figura 8 – Fotomicrografias histológicas do tecido muscular cardíaco	131
Figura 9 – Fotomicrografias histológicas do parênquima hepático	133
Figura 10 – Fotomicrografias histológicas do córtex renal	136
Figura 11 – Fotomicrografias histológicas de cortes pancreáticos	151
Figura 12 – Fotomicrografias histológicas do tecido muscular cardíaco	157
Figura 13 – Fotomicrografia histológica do tecido muscular cardíaco de animais do grupo DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo), mostrando pericardite	158
Figura 14 – Fotomicrografias histológicas do parênquima hepático	160
Figura 15 – Fotomicrografias histológicas do córtex renal	162
Figura 16 – Fotomicrografias histológicas do córtex renal, processo de glomerulonefrite no animais do grupo DCN, animais diabéticos controle negativo.	163

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito antioxidante do extrato metanólico de <i>Cecropia pachystachya</i> através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	111
Gráfico 2 – Efeito antioxidante do extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	112
Gráfico 3 – Efeito antioxidante dos extratos metanólico e acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> , na concentração de 30 mg, através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	112
Gráfico 4 – Área sob a curva dos níveis de glicemia em ratos diabéticos e normais após a indução com estreptozotocina 40 mg/kg i.v.	117
Gráfico 5 – Área sob a curva de evolução da massa corporal (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais tratados com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	126
Gráfico 6 – Atividade hipoglicemiante de uma formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> . Avaliação da concentração ideal de carboximetilcelulose	144
Gráfico 7 – Avaliação da concentração ideal de carboximetilcelulose. Teste oral de tolerância à glicose	145
Gráfico 8 – Definição da dose ideal do extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> . Teste oral de tolerância à glicose	147
Gráfico 9 – A Área sob a curva dos níveis de glicemia em ratos diabéticos e normais após a indução com estreptozotocina 40 mg/kg i.v.	149
Gráfico 10 – Área sob a curva de evolução da massa corporal (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	154

Gráfico 11 – A Área sob a curva dos níveis de glicemia em ratos diabéticos e normais após interrupção do tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul e controle negativo	170
Gráfico 12 – Área sob a curva de evolução da massa corporal (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais após interrupção do tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	175
Gráfico 13 – Efeito do tratamento prévio com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> na indução ao diabetes melito utilizando estreptozotocina	178
Gráfico 14 – Área sob a curva de evolução da massa corporal (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) em ratos machos normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> em diferentes concentrações. Estudo de toxicidade aguda em machos	183
Gráfico 15 – Área sob a curva de evolução da massa corporal (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) em ratos fêmeas normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> em diferentes concentrações. Estudo de toxicidade aguda em fêmeas	186

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais recursos farmacológicos para o tratamento de todos os tipos de diabetes melito	39
Tabela 2 – Concentração e parâmetros da curva de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) do ácido clorogênico, isoorientina e orientina	106
Tabela 3 – Precisão por repetibilidade do método para doseamento de ácido clorogênico, isoorientina e orientina	106
Tabela 4 – Redução da glicemia de jejum dos animais diabéticos tratados com extratos metanólico (EM) e acetato de etila (EAE) de <i>Cecropia pachystachya</i> , glibenclamida e metformina	118
Tabela 5 – Níveis de insulina, frutossamina, glicose-6-fosfatase e glicogênios hepático e muscular de animais diabéticos e normais tratados com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	124
Tabela 6 – Perfil lipídico de ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	128
Tabela 7 – Avaliação de parâmetros de função hepática em ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	132
Tabela 8 – Avaliação de parâmetros de função renal em ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	135
Tabela 9 – Parâmetros hematológicos de ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	138
Tabela 10 – Níveis de malonaldeído e enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutatona reduzida, em ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	141

Tabela 11 – Porcentagens de redução da glicemia dos animais diabéticos tratados com formulações farmacêuticas contendo diferentes concentrações de carboximetilcelulose ao longo do TOTG	145
Tabela 12 – Níveis de insulina, frutossamina, glicose-6-fosfatase e glicogênios hepático e muscular de animais diabéticos e normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	150
Tabela 13 – Perfil lipídico de ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	156
Tabela 14 – Avaliação de parâmetros de função hepática em ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	159
Tabela 15 – Avaliação de parâmetros de função renal em ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	161
Tabela 16 – Parâmetros hematológicos de ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	164
Tabela 17 – Níveis de malonaldeído e enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutathione reduzida, em ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	167
Tabela 18 – Avaliação de parâmetros bioquímicos em ratos após interrupção de tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controle negativo	172
Tabela 19 – Avaliação de parâmetros hematológicos em ratos após interrupção de tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controle negativo	176

Tabela 20 – Níveis de malonaldeído e enzimas antioxidantes, catalase, superóxido desmutase e glutathione reduzida, em ratos diabéticos e normais após interrupção do tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de <i>Cecropia pachystachya</i> e controles negativo e positivos	177
Tabela 21 – Avaliação de toxicidade aguda em ratos machos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila.....	181
Tabela 22 – Avaliação de parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade aguda em ratos machos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila	182
Tabela 23 – Avaliação de parâmetros bioquímicos do estudo de toxicidade aguda em ratos fêmeas tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila	184
Tabela 24 – Avaliação de parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade aguda em ratos fêmeas tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila	185

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % – porcentagem
- °C – graus Celsius
- 100x – objetiva microscópica de 10
- 200x – objetiva microscópica de 20
- 400x – objetiva microscópica de 40
- 40x – objetiva microscópica de 4
- Ab – albumina
- AcOEt – acetato de etila
- ADP – adenina difosfato
- AGEs – produtos finais de glicação avançada
- ALP – fosfatase alcalina
- ALT – alanina aminotransferase
- AMPK – proteína quinase ativada por adenina monofosfato
- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AST – aspartato aminotransferase
- ATP – adenina trifosfato
- ATPase – enzima de hidrólise da adenina trifosfato
- Ba – basófilo
- BD – bilirrubina direta
- BHT – 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol
- BI – bilirrubina indireta
- BT – bilirrubina total
- CAT – catalase
- CE₅₀ – concentração efetiva
- CHCM – concentração média da hemoglobina corpuscular
- CI₅₀ – concentração inibitória
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

cm – centímetro

CM – cromatina marginalizada

CMC – carboximetilcelulose

CN – controle negativo

CNI – controle negativo induzidos

CNNI – controle negativo não induzidos

Crt – creatinina

CT – colesterol total

DAG – diacilglicerol

db/db – linhagem de camundongos diabéticos

DCMC_DCN – diabéticos controle negativo carboximetilcelulose 0,5%

DCMC_DCN 0,2% – diabéticos controle negativo de carboximetilcelulose 0,2%

DCMC_DCN 0,5% – diabéticos controle negativo de carboximetilcelulose 0,5%

DCMC_DCN 0,8% – diabéticos controle negativo de carboximetilcelulose 0,8%

DCMC_DCN 1,0% – diabéticos controle negativo de carboximetilcelulose 1,0%

DCMC_EAE 0,2% – diabéticos carboximetilcelulose 0,2% com extrato em acetato de etila

DCMC_EAE 0,5% – diabéticos carboximetilcelulose 0,5% com extrato em acetato de etila

DCMC_EAE 0,8% – diabéticos carboximetilcelulose 0,8% com extrato em acetato de etila

DCMC_EAE 1,0% – diabéticos carboximetilcelulose 1,0% com extrato em acetato de etila

DCMC_EAE 10 mg/kg– diabéticos carboximetilcelulose 0,5% com extrato em acetato de etila 10 mg/kg

DCMC_EAE 20 mg/kg– diabéticos carboximetilcelulose 0,5% com extrato em acetato de etila 20 mg/kg

DCMC_EAE 40 mg/kg– diabéticos carboximetilcelulose 0,5% com extrato em acetato de etila 40 mg/kg

DCMC_EAE 60 mg/kg– diabéticos carboximetilcelulose 0,5% com extrato em acetato de etila 60 mg/kg

DCMC_EAE 80 mg/kg– diabéticos carboximetilcelulose 0,5% com extrato em

acetato de etila 80 mg/kg

DCN – diabéticos controle negativo

DCNT – doenças crônicas não transmissíveis

DCV – doenças cardiovasculares

DEAE – diabéticos extrato em acetato de etila

DEM – diabéticos extrato metanólico

DG – diabéticos glibenclamida

DGM – diabéticos glimepirida

dL – decilitro

DM – diabetes melito

DM – diabéticos metformina

DNA – deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

DP – desvio padrão

DPPH – 2,2'-difenil-1-picrihidrazil

EAE – extrato em acetato de etila

EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

eixo x – eixo das abscissas (coordenada vertical de um ponto num referencial plano de coordenadas cartesianas)

eixo y – eixo das ordenadas (coordenada horizontal de um ponto num referencial plano de coordenadas cartesianas)

ELISA – Enzyme-Linked immunosorbent assay

EM – extrato metanólico

ERNs – espécies reativas de Nitrogênio

EROs – espécies reativas de Oxigênio

et al. – et alia (expressão que expressa os demais autores da referência)

eu – eosinófilo

FDA - Food and Drug Administration

FeCl₃ – cloreto férrico

FF – formulação farmacêutica

FF 1000 – animais tratados com formulação farmacêutica 1000 mg/kg

FF 200 – animais tratados com formulação farmacêutica 200 mg/kg

FF 2000 – animais tratados com formulação farmacêutica 2000 mg/kg

FF 600 – animais tratados com formulação farmacêutica 600 mg/kg
FFCN – formulação farmacêutica controle negativo
FFD – formulação farmacêutica diabéticos
FFI – formulação farmacêutica induzidos
FFN – formulação farmacêutica normais
FFNI – formulação farmacêutica não induzidos
Fr – Frutosamina
g – grama
G6P – glicose-6-fosfato
G6Pase – glicose-6-fosfatase
Gb – globulina
GGT – γ -glutamil-transferase
GIP – glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP1 – glucagon-like peptide-1
GLUT 1 – Transportador de glicose 1
GLUT 2 – transportador de glicose 2
GLUT 4 – transportador de glicose 4
GSH – glutathiona reduzida
GSSG – glutathiona oxidada
H&E – hematoxilina e eosina
 H^+ – próton
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
 H_3PO_4 – ácido fosfórico
Hb – concentração de hemoglobina
HbA1c – hemoglobina glicada
HCM – hemoglobina corpuscular média
HDL – high density lipoprotein (lipoproteína de alta densidade)
Htc – hematócrito
Htm – hematimetria
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC – inclinação da curva de calibração
IDF – Federação Internacional de Diabetes

IDF – Internacional Diabetes Federation

K^+ – íon potássio

$K_3Fe(CN)_6$ – ferricianeto de potássio

KCl – Cloreto de potássio

Kg – quilograma

KOH – hidróxido de potássio

L – litro

Lc – Lactato

LDH – lactato desidrogenase

LDL – low density lipoprotein (lipoproteína de baixa densidade)

Li – linfócito

LOD – limite de detecção

LOQ – limite de quantificação

LT – leucometria total

M – molar

MDA – malonaldeído

MeOH – metanol

mg – micrograma

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

μ M – micromol

mM – milimol

Mo – monócito

n – número de amostras

Na^+ – íon sódio

NAD – nicotinamide adenina dinucleotídeo oxidado

NAD^+ – nicotinamide adenina dinucleotídeo oxidado

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

$NADP^+$ – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NaOH – Hidróxido de sódio

NBT – nitroblue tetrazolium

NCMC_DCN 1,0% – normais controle negativo de carboximetilcelulose 1,0%

NCMC_EAE 0,2% – normais carboximetilcelulose 0,2% com extrato em acetato de etila

NCMC_EAE 0,5% – normais carboximetilcelulose 0,5% com extrato em acetato de etila

NCMC_EAE 0,8% – normais carboximetilcelulose 0,8% com extrato em acetato de etila

NCMC_EAE 1,0% – normais carboximetilcelulose 1,0% com extrato em acetato de etila

NCMC_NCN 0,2% – normais controle negativo de carboximetilcelulose 0,2%

NCMC_NCN 0,5% – normais controle negativo de carboximetilcelulose 0,5%

NCMC_NCN 0,8% – normais controle negativo de carboximetilcelulose 0,8%

NCN – normais controle negativo

Ne – neutrófilo

NEAE – normal extrato em acetato de etila

NEM – normal extrato metanólico

nm – nanômetro

nM – nanomol

NO – óxido Nítrico

ns – não significativo

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – significância estatística

p/v – parte por volume

PD – proliferação ductal

pH – potencial hidrogeniônico

Pi – fosfato inorgânico

PKC – proteína quinase C

PT – proteínas totais

r – coeficiente de correlação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – rotações por minuto

RSD – desvio padrão relativo

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SOD – superóxido dismutase

STZ – estreptozotocina

SUS – Sistema Único de Saúde

TBA – thiobarbituric acid (ácido tiobarbitúrico)

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TG – triglicérides

TGF – taxa de filtração glomerular

TOTG – teste oral de tolerância à Glicose

U/Kg – unidade por quilograma

UI/mL – unidade internacional por mililitro

Ur – ureia

v/v – volume por volume

VCM – volume corpuscular médio

VLDL – very low density lipoprotein (lipoproteína de muito baixa densidade)

WHO – World Health Organization

μL – microlitro

μm – micrômetro

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
1 INTRODUÇÃO	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1 DIABETES MELITO	31
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA	33
2.1.2 ETIOPATOGENIA E CLASSIFICAÇÃO	35
2.1.3 TRATAMENTO	38
2.1.4 DIABETES MELITO EXPERIMENTAL	46
2.2 DIABETES MELITO E ESTRESSE OXIDATIVO	49
2.2.1 COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELITO	52
2.2.2 O USO DE ANTIOXIDANTES NA PREVENÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELITO	54
2.3 A UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS HIPOGLICEMIANTES	55
2.3.1 PRODUTOS NATURAIS HIPOGLICEMIANTES E PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO	57
2.3.2 A ESPÉCIE <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	60
2.3.3 O USO DE FITOTERÁPICOS COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DOS SINTOMAS DO DIABETES MELITO	67
3 OBJETIVOS	74
3.1 OBJETIVO GERAL	74
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
3.2.1 Com extratos metanólico (EM) e em acetato de etila (EAE) das folhas de <i>Cecropia pachystachya</i>	74

3.2.2 Com a formulação farmacêutica contendo o extrato padronizado em acetato de etila	76
4 MATERIAL E MÉTODOS	77
4.1 MATERIAL VEGETAL	77
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS	78
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS MARCADORES MOLECULARES DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i>	79
4.3.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	79
4.3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA	80
4.3.3 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DA ANÁLISE QUANTITATIVA	80
4.4 ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i>	82
4.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE in vitro	82
4.4.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i> EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	85
4.4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i> EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	91
4.5 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ORAL CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Cecropia pachystachya</i>	93
4.5.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA	93
4.5.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE CRÔNICA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	96
4.5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	98
4.5.4 EFEITO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA APÓS INTERRUÇÃO DO TRATAMENTO EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	99
4.6 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Cecropia pachystachya</i> EM RATOS DIABÉTICOS E NORMAIS	100

4.7 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS	101
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	103
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS MARCADORES MOLECULARES DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i>	104
5.2 ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i>	110
5.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE in vitro	110
5.2.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i> EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	115
5.2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>Cecropia pachystachya</i> EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	139
5.3 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ORAL CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Cecropia pachystachya</i> ..	143
5.3.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA	143
5.3.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE CRÔNICA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	148
5.3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	166
5.3.4 EFEITO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA APÓS INTERRUPTÃO DO TRATAMENTO EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS	169
5.4 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE <i>Cecropia pachystachya</i> EM RATOS DIABÉTICOS E NORMAIS	178
5.5 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS	180
6 CONCLUSÃO	188
7 REFERÊNCIAS	190

1 INTRODUÇÃO

Diabetes melito engloba uma série de alterações metabólicas que acarretam um estado crônico de hiperglicemia decorrente de uma redução na secreção de insulina e/ou perda da capacidade deste hormônio exercer adequadamente seus efeitos (ADA, 2013). A hiperglicemia persistente, característica dessa doença, é responsável por um aumento do estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou de nitrogênio (ERNs) produzidas pela célula (DOMINGUEZ et al., 1998; MARITIM, et al., 2003). Diversos mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo em situação de hiperglicemia, por exemplo, auto oxidação da glicose; glicação de proteínas, bem como a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (O'DONNELL e FREEMAN, 2001).

A Federação Internacional de Diabetes (IDF) estimou que em 2011 cerca de 12,4 milhões de adultos entre 20 e 79 anos seriam portadores de algum tipo de DM. Estimativas publicadas por essa mesma Federação indicam que, no Brasil, em 2012, esse número já chegou a 13,4 milhões, com projeção de atingir a marca de 19,6 milhões em 2030 (IDF, 2012).

Atualmente, o DM se classifica em quatro classes clínicas, diabetes melito tipo 1 e 2, outros tipos específicos de diabetes e diabetes gestacional. Ainda existem duas categorias que são a glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída (RIBEIRO et al., 2009).

No DM tipo 1, a causa primária envolve a deficiência na secreção de insulina devido à destruição autoimune das células B pancreáticas (AIRES, 2012). Esses pacientes necessitam de uma terapia de reposição de insulina assim que diagnosticada a hiperglicemia.

Já no DM tipo 2, ocorrem distúrbios na ação e secreção da insulina. Em geral, ambos os distúrbios estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. O tratamento inicial desses pacientes portadores de DM tipo 2 envolve dieta e exercícios físicos sob orientação médica e

nutricional. Posteriormente, com a evolução da doença, o uso de antidiabéticos orais se torna necessário. Em cerca de um terço dos pacientes com DM tipo 2, o controle diabético só é atingido com o uso de insulinoterapia, associada a antidiabéticos orais ou isolada (RANG e DALE, 2007).

A terapia do DM, no entanto, torna-se onerosa ao SUS, em vista do crescente número de pacientes portadores da doença. Além disso, é uma causa importante de abandono ao tratamento a inadequação de doses e medicamentos, além do próprio ônus gerado ao paciente (WHO, 2013). Diante disso, verifica-se uma tendência crescente na busca por recursos alternativos e adjuvantes no tratamento do diabetes. 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 DM. No Brasil, encontram-se diversas plantas com ação hipoglicemiante oferecendo, assim, potencial para a pesquisa científica que valide o seu uso com eficácia e segurança (CARREIRA et al., 2007).

Buscando novas alternativas de tratamento, muitas espécies de plantas conhecidas na medicina popular pelas propriedades hipoglicemiantes têm sido avaliadas (ABDEL-BARRY, ABDEL-HASSAN e AL-HAKIEM, 1997). Essas pesquisas almejam 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).

Diante dessa realidade, muitas espécies de plantas têm sido testadas como adjuvantes no tratamento do DM. Entre essas espécies está *Cecropia pachystachya* Trécul (URTICACEAE), uma planta nativa do Brasil, cujos nomes populares são embaúba, imbaíba, umbaúba, árvore-de-preguiça, barbeira, torém. É usada para o tratamento da asma e tosse, e já foi citada como diurético e cardiotônico (SORARU e BANDONI, 1978). Devido ao seu extenso uso popular, já foi incluída na Farmacopeia Argentina (1978), onde é preparada como infusão a 5% ou decocção 4%. Entretanto, nem todos os seus efeitos farmacológicos foram comprovados cientificamente através de ensaios pré-clínicos, sendo demonstrada recentemente

sua atividade hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano, por um período de tratamento de 42 dias (ARAGÃO et al., 2010).

Em estudos anteriores demonstramos que o extrato metanólico das folhas de *Cecropia pachystachya* apresentou significativa atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por aloxano. Em um teste oral de tolerância de glicose, observou-se uma redução de 70% da glicemia em relação à glicemia de jejum de ratos diabéticos tratados com o extrato metanólico, resultado semelhante ao controle positivo, tratado com Glibenclamida. Essa redução não foi observada para ratos diabéticos controle negativo (ARAGÃO et al., 2010).

No mesmo estudo (ARAGÃO et al., 2010), o extrato metanólico apresentou também significativa redução da glicemia de jejum, quando comparado ao grupo controle negativo, após 6 e 42 dias de tratamento (20 e 40%, respectivamente). Resultados semelhantes foram verificados para os controles positivos Glibenclamida e Metformina. Ao final de 42 dias de tratamento os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para avaliar o possível efeito toxicológico do extrato vegetal. Essa avaliação envolveu a análise de parâmetros bioquímicos, incluindo provas de funções hepática e biliar, renal e pancreática, avaliação dos perfis lipídico e proteico; e parâmetros hematológicos. Não foi observada nenhuma alteração significativa dentre os parâmetros avaliados, evidenciando a ausência de toxicidade no modelo animal adotado.

Além da avaliação hipoglicemiante, foi realizada uma avaliação histológica dos tecidos hepático e renal a fim de se verificar a presença de hepatotoxicidade e toxicidade renal. A análise dos cortes histológicos evidenciou tecido renal de aspecto habitual. Na análise dos cortes do parênquima hepático, os animais tratados com o extrato metanólico apresentaram hepatócitos com núcleo e citoplasma sem alterações patológicas. Já nos animais do grupo controle negativo, 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 alterados (significativamente elevados, $p < 0,05$), encontrados para esse grupo (ARAGÃO et al., 2010).

O estudo concluiu que o extrato metanólico, assim como as drogas utilizadas

como controle positivo (Glibenclamida e Metformina), não apresentaram nenhum tipo de toxicidade durante o período analisado (42 dias), garantindo sua biossegurança. É importante ressaltar que, nesse estudo, o extrato metanólico não exerceu nenhum tipo de efeito hipoglicemiante em animais normais, ou seja, aqueles que não foram induzidos com o agente diabetogênico aloxano.

Neste contexto, seria muito importante avaliar o efeito hipoglicemiante e antioxidante de extratos das folhas de *Cecropia pachystachya*, além de formulações contendo esses extratos, a fim de se contribuir na terapia desta doença principalmente no auxílio da redução dos efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo, normalmente associado ao estado hiperglicêmico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIABETES MELITO

O diabetes melito é resultado de uma secreção inapropriada de insulina pelas células B pancreáticas, de defeitos na ação da insulina ou a associação desses dois distúrbios. O termo não constitui uma única doença, mas sim um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, com etiologias diversas, que apresentam em comum uma hiperglicemia crônica acompanhada de alterações do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (WHO, 2013)

A hiperglicemia a longo prazo está associada a uma série de alterações teciduais, denominadas, em conjunto, de complicações crônicas do diabetes. Essas incluem micro e macroangiopatias, caracterizadas, respectivamente, por alterações de pequenos e grandes vasos. As microangiopatias englobam, principalmente, a retinopatia e a nefropatia. Já as macroangiopatias manifestam-se clinicamente como doença arterosclerótica, cerebrovascular ou vascular periférica, sendo a neuropatia periférica (GUYTON e HALL, 2011).

A hiperglicemia ocorre em decorrência de uma homeostase hepática alterada, com concomitantes reduções da captação de glicose pelo músculo esquelético e da síntese de glicogênio. Como consequência, o limiar renal para absorção de glicose é excedido e esta é excretada na urina (glicosúria). A glicosúria, por sua vez, causa uma diurese osmótica (poliúria) que, por sua vez, resulta em desidratação, sede e aumento na ingestão de líquidos (polidipsia). A deficiência de insulina causa ainda o emagrecimento pelo aumento na degradação e redução na síntese de proteínas. Desenvolve-se ainda na ausência de insulina a cetoacidose diabética, uma emergência aguda que ocorre em razão de uma acelerada degradação de ácidos graxos em acetil-CoA. A acetil-CoA, por sua vez, na ausência de metabolismo aeróbico adequado de carboidratos é convertida em acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona, compostos conhecidos como corpos cetônicos que causam a acidose

(RANG e DALE, 2007).

As complicações relacionadas ao DM desenvolvem-se, muitas vezes, em consequência do descontrole glicêmico no decorrer de muitos anos. Muitas dessas complicações, como mencionado anteriormente, resultam de alterações vasculares; sejam elas em pequenos vasos (microangiopatia) ou em grandes vasos (macroangiopatia). A disfunção do endotélio vascular é um evento precoce e crítico no desenvolvimento dessas complicações (AIRES, 2012).

A doença macrovascular pode ser caracterizada principalmente pelo desenvolvimento acelerado de placas de ateroma e suas complicações trombóticas. Essas complicações são mais comuns e mais graves em pacientes diabéticos. A microangiopatia, por sua vez, é uma característica peculiar do DM e afeta, particularmente, a retina, os rins e os nervos periféricos (RANG e DALE, 2007).

O DM é a causa mais comum de insuficiência renal crônica, um grave problema de saúde pública em razão dos altos custos gerados tanto para a sociedade, quanto para o próprio paciente. A hipertensão coexistente, por sua vez, promove também dano renal progressivo, sendo este retardado com o tratamento adequado e manutenção da pressão arterial normal. Por outro lado, tanto a neuropatia quanto a retinopatia estão associadas ao acúmulo de metabólitos osmoticamente ativos da glicose, produzidos por ação da aldolase redutase (RANG e DALE, 2007).

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

Em 16 de maio de 2012, a Organização Mundial de Saúde publicou um comunicado que deu destaque ao crescente problema das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Segundo esse comunicado, 1 a cada 3 adultos no mundo, tem pressão alta, uma das causas de metade das mortes por acidente vascular cerebral e doença do coração. Além disso, 1 a cada 10 adultos no mundo são diabéticos. O comunicado evidencia, ainda, o aumento de condições que desencadeiam doenças cardíacas e outras doenças crônicas, particularmente em países subdesenvolvidos (WHO, 2013).

Dentre as DCNT citadas nesse comunicado, o diabetes melito é considerado um fardo econômico, social e pessoal para as instituições e famílias. Segundo a WHO (2013), o DM representa um grande desafio para a saúde e o desenvolvimento humano, principalmente em países de baixa condição socioeconômica (WHO, 2013).

O comunicado destaca que a prevalência média de pacientes diabéticos no mundo está em 10% da população (cerca de 366 milhões), embora em muitas regiões, como as ilhas do Pacífico, esse valor chegue a 33%. Os pacientes com tratamentos inadequados, ou sem tratamento algum, desenvolvem precocemente doenças cardiovasculares, neuropatias, retinopatias e insuficiência renal. A obesidade também é um tema em destaque nesse mesmo comunicado. Segundo este, o número de pacientes obesos dobrou entre 1980 e 2008. Hoje, meio bilhão de pessoas no mundo (12% da população mundial) são consideradas obesas. A obesidade, por sua vez, foi apontada como umas das causas importantes do desenvolvimento de DM (WHO, 2013).

Além disso, dados publicados na última edição do atlas da IDF (The IDF Diabetes Atlas) apontam que as estimativas não são nada promissoras. Segundo esse Atlas, em 2030, o número de portadores de DM saltará dos atuais 366 milhões para mais de 552 milhões. O Atlas ainda destaca que, atualmente cerca 183 milhões de pessoas no mundo são diabéticos não-diagnosticados. Os dados mostram que, se esses pacientes fossem devidamente diagnosticados, os números atuais de

portadores de DM aumentariam em 50%, chegando a, aproximadamente, 550 milhões (IDF, 2012).

De acordo com o último censo brasileiro (IBGE 2010) e a Sociedade Brasileira de Diabetes, mais de 12 milhões de brasileiros são portadores de DM. Com esse número, o país ocupa a quinta posição entre os 10 países com o maior número de pacientes diabéticos entre 20 e 79 anos. Estima-se que, até 2030, haverá cerca de 20 milhões de brasileiros portadores de DM. Segundo essa projeção, o Brasil passaria a ocupar a quarta posição entre os 10 países com o maior número de pacientes diabéticos entre 20 e 79 anos (IDF, 2012).

O crescimento da prevalência do DM, além de outras condições associadas, como a mortalidade prematura e os custos envolvidos no controle e tratamento das complicações tem levado essa condição crônica a um grave problema de Saúde Pública de proporções epidêmicas e alarmantes (GLASGOW et al., 1999; BRASIL, 2011; WHO, 2012). Em 2011, um estudo realizado em 8 cidades brasileiras mostrou que os custos diretos e indiretos do tratamento ambulatorial com pacientes diabéticos chega a 3 milhões de reais a cada 1000 pessoas, ou seja, 3 mil reais por pessoa (BAHIA et al., 2011).

Com base na epidemiologia apresentada e suas consequências para a população mundial e políticas de saúde, DM constitui uma das mais importantes condições crônicas de saúde, impondo a necessidade de controle e tratamento eficazes (SILVEIRA et al., 2010).

Dois importantes estudos clínicos para o controle do DM, o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT, 1993) e o *United Kingdom Prospective Diabets Stud Group* (UKPDS, 1998) mostraram que as mudanças no hábito de vida pela educação permanente das pessoas com DM resultam em benefícios que reduzirão os riscos cardiovasculares. Essas mudanças envolvem tanto a redução de massa corporal quanto os controles adequados da glicemia, da pressão arterial e teor de lipídios. Dessa forma, o controle metabólico é obtido por meio de educação contínua do paciente, monitoramento glicêmico, terapia nutricional, atividade física regular, informações sobre a prevenção e tratamento das complicações agudas e crônicas, além da busca permanente por esquemas terapêuticos farmacológicos que visem reforçar esses objetivos de tratamento desse paciente (ADA, 2012).

Pela natureza crônica da doença, os problemas de saúde gerados pelo DM requerem gerenciamento contínuo por vários anos e décadas (BRASIL, 2008; PAIM, 2011; WHO, 2013). A complexidade do regime terapêutico, que inclui, na maioria dos casos, além da mudança no hábito de vida, múltiplos medicamentos e adequação de dosagens torna-se um desafio. Visando um retardo no desenvolvimento de complicações associadas, as adaptações comportamentais e terapêuticas tornam-se necessárias ao controle adequado da doença (WAGNER et al., 2001; SELEY e WEINGER, 2007).

2.1.2 ETIOPATOGENIA E CLASSIFICAÇÃO

Muitos fatores são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento do DM e suas complicações. Entre eles destacam-se fatores perinatal, genético, dietético, hábito de vida, idade e obesidade (SINGH, ARMSTRONG e LIPSKY, 2005). Pesquisas demonstram que o fator inflamatório também está envolvido no desenvolvimento da doença e suas complicações. Esses processos inflamatórios são associados com diabetes tipo 1 e tipo 2, apesar da etiologia distinta entre os dois tipos de DM (AIRES, 2012).

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto os termos diabetes melito insulino-dependente e diabetes melito insulino-independente devem ser eliminados. A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e *diabetes mellitus* gestacional. Ainda existem duas categorias, referidas que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (DCV) (ADA, 2012; SBD, 2012; WHO, 2013).

O DM tipo 1 é um distúrbio catabólico em que a insulina está ausente; o glucagon elevado e as células B 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. DM tipo 1 resulta primariamente da destruição das células B 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 β é idiopática (tipo 1b). É diagnosticada principalmente em crianças e jovens, mas pode ocorrer também em adultos. A taxa de destruição de células B 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 DM tipo 1 são: poliúria, polidipsia, 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 DM tipo 2, a forma mais comum de diabetes (correspondendo de 85 a 90% dos casos), caracteriza-se por distúrbios na ação e secreção da insulina. Nesse tipo de diabetes, 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 DM tipo 2 é obesa, e a obesidade leva a uma aumento da resistência à insulina (RIBEIRO et al., 2009). 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 (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 β , 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 redução na sua secreção diminuem a eficiência de utilização periférica da glicose, 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, 2011). 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 (ADA, 2005; GUYTON e HALL, 2011). As complicações do diabetes comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes.

Em 2008, foram estabelecidos pela American Diabetes Association (ADA) 3 critérios de diagnóstico do DM. O primeiro critério inclui duas glicemias de jejum maiores ou iguais a 126 mg/dL. No segundo critério, glicemia superior a 200 mg/dL no teste de tolerância oral à glicose (TTOG), que consiste na avaliação da glicemia 2 horas após ingestão de 75 g de glicose. E por fim, glicemia casual (a qualquer hora do dia) superior a 200 mg/dL associada a sintomas do DM. 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 125 mg/dL ou entre 140 e 199 mg/dL após o TTOG, é classificado como pré diabetes. Além das glicemias, a dosagem de hemoglobina glicada é outro parâmetro utilizado como ferramenta diagnóstica. Pacientes portadores de pré diabetes apresentam os valores de hemoglobina glicada entre 5,7 e 6,4%, enquanto que pacientes diagnosticados com DM apresentam valores acima de 6,5% (ADA, 2012).

2.1.3 TRATAMENTO

O diabetes melito, como já mencionado, é uma doença heterogênea, que compreende diversas alterações metabólicas associadas à hiperglicemia. Por essa razão, seu tratamento sempre requer uma abordagem ampla e multifatorial, desde a educação e mudança no estilo de vida até a intervenção farmacológica específica (ADA, 2012; SBD, 2012; WHO, 2013).

O objetivo primordial do tratamento do DM é o controle metabólico adequado do paciente, reduzindo os seus riscos de morbidade e mortalidade. 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 é obtido, estão indicadas as medidas medicamentosas com os antidiabéticos orais e a insulina (SBD, 2012).

O tratamento medicamentoso do DM 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 B e, nos casos de diabetes tipo 1, a reposição de insulina (RAMALHO, 2002).

Como mencionado anteriormente, a insulina é essencial para o tratamento do DM tipo 1. Por outro lado, nos pacientes portadores de DM tipo 2 isso é extremamente variável, podendo iniciar com a adequação dos planos alimentar e de atividade física, passando ao uso de antidiabéticos, podendo, inclusive, chegar à utilização da própria insulina em determinadas etapas de evolução da doença (RANG e DALE, 2007).

A Tabela 1 (página 39) resume os principais recursos farmacológicos para o tratamento de todos os tipos de DM, seus principais mecanismos de ação, principais exemplos, posologia e efeitos adversos de cada uma das classes de medicamentos listadas.

Tabela 1: Principais recursos farmacológicos para o tratamento de todos os tipos de diabetes melito

Classe de medicamento	Mecanismo de ação	Fármacos	Posologia	Efeitos adversos
Sulfonilureias	Secretagogo B pancreático de ação lenta	Glibenclamida Glipizida Glicazida Glimepirida	2,5 a 20 mg 2,5 a 20 mg 40 a 320 mg 1 a 8 mg (de 1 a 2 doses diárias)	Hipoglicemia e aumento de massa corporal
Biguanidas	Redução da produção hepática de glicose e aumento da sensibilidade à insulina	Metformina	1000 a 2550 mg (2 doses diárias)	Desconforto abdominal e diarreia
Inibidores de α-glicosidase	Retardo na absorção intestinal de carboidratos	Acarbose	50 a 300 mg (3 doses diárias)	Meteorismo, flatulência e diarreia
Glitinidas	Secretagogos B-pancreáticos de ação rápida	Repaglinida Nateglinida	0,5 a 16 mg 120 a 360 mg (3 doses diárias)	Hipoglicemia e aumento de massa corporal
Tiazolidinedionas ou glitazonas	Aumento da sensibilidade à insulina e redução da produção hepática de glicose	Rosiglitazona Pioglitazona	2 a 8 mg 15 a 45 mg (1 dose diária)	Edema, anemia e aumento de massa corporal
Análogos do peptídeo GLP-1	Variados	Exenatida	5 a 10 g (SC) (2 doses diárias)	Náuseas e vômitos
Insulina	Suplemento para células B pancreáticas	Insulinas ultrarápida, rápida, intermediária, NPH, lenta, prolongada ultralenta	Variadas e ajustadas à glicemia do paciente	Hipoglicemia

Fonte: RIBEIRO et al., 2009

Sulfonilureias

As sulfonilureias são secretagogos de insulina. Sua ação é determinada pela ligação a receptores nas células B pancreáticas (subunidade SUR1 do canal de potássio), resultando na secreção de insulina (MALAISSE e LEBRUN, 1990). Estes agentes têm ótima eficácia no tratamento da hiperglicemia do DM tipo 2, resultando em redução da hemoglobina glicada semelhante à metformina (BOLEN et al. 2007). Além disso, são bem tolerados e de baixo custo, tornando-se a segunda opção no tratamento do DM tipo 2 (NATHAN et al., 2009).

Os novos agentes, de segunda geração (glimepirida, gliclazida), são mais potentes e resultam em menor taxa de hipoglicemia grave (HOLSTEIN, PLASCHKE e EGBERTS, 2001). Os principais efeitos adversos são a hipoglicemia e o ganho de peso de 1 a 4 kg (BOLEN et al., 2007). As contraindicações ao seu uso são insuficiência renal e hepática.

Biguanidas

A metformina é o representante das biguanidas disponível atualmente. Atua através da redução da resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e outros tecidos periféricos, com consequente inibição da gliconeogênese hepática. Assim, seu principal efeito ocorre sobre a glicemia de jejum, sem acarretar hipoglicemia (BAILEY e TURNER, 1996; LIBBY et al., 2009). Possui ótima eficácia no tratamento do DM tipo 2, com redução da hemoglobina glicada em torno de 1 – 2% (BOLEN et al., 2007), além de estar associada à redução de complicações macrovasculares em pacientes obesos (UKPDS, 1998) e usuários de insulina (SELVIN et al., 2008; KOOY et al., 2009).

Uma outra vantagem das biguanidas é a ausência de alteração na massa corporal, podendo a metformina até mesmo reduzi-la. Recentemente, o uso de metformina vem sendo associado à menor taxa de câncer (LIBBY et al., 2009). Desta forma, recomenda-se a utilização de metformina em todos os pacientes com DM tipo 2 na ausência de contraindicações.

Como efeitos colaterais, náusea, diarreia e dor abdominal acometem até um terço dos pacientes. A introdução lenta da medicação, com dose baixa uma vez ao dia, em uma das refeições, com aumento gradual, pode resultar em melhor tolerância em até 90% dos pacientes com uso continuado. A metformina de liberação lenta associa-se à menor incidência de náuseas no início do tratamento (SCHWARTZ et al., 2006). A acidose láctica é um evento raro e quase exclusivo dos pacientes com contraindicações ao uso da medicação (BAILEY e TURNER, 1996). Pode ocorrer deficiência de absorção da vitamina B12, porém raramente associado à anemia (WULFFELÉ et al., 2003). As contraindicações para seu uso são doença renal com taxa de filtração glomerular (TFG) abaixo de 30 mL/min/1,73 m², insuficiência hepática, hipoxemia e infecções graves (BAILEY e TURNER, 1996; RACHMANI et al., 2002).

Inibidores de α -glicosidase

A acarbose é um inibidor da α -glicosidase, enzima responsável pelo último passo da digestão dos carboidratos nas vilosidades do duodeno. Desta forma, a absorção dos carboidratos ocorre tardiamente, concomitante à secreção de insulina, com consequente redução da glicemia pós-prandial (BALFOUR e McTAVISH, 1993; VAN DE LAAR et al., 2005). Possui benefício moderado no controle glicêmico, com redução da hemoglobina glicada em torno de 0,7% (VAN DE LAAR et al., 2005), estando indicada naqueles pacientes com glicemia de jejum adequada e glicemia pós-prandial elevada.

Em pacientes com tolerância diminuída à glicose, a acarbose foi associada à redução de eventos cardiovasculares combinados (CHIASSON et al., 2003), benefícios estes não comprovados em pacientes com DM tipo 2 (BOLEN et al., 2007). Outras vantagens são a ausência de ganho de massa corporal ou hipoglicemia (BALFOUR e McTAVISH, 1993; VAN DE LAAR et al., 2005; NATHAN et al., 2009).

Os efeitos adversos gastrintestinais ocorrem em até 30% dos pacientes, principalmente flatulência, mas também diarreia e dor abdominal. O uso em dose superior a 50 mg, 3 vezes ao dia resultou em maiores taxas de efeitos adversos, sem benefício no controle glicêmico (VAN DE LAAR et al., 2005). Cirrose, doenças gastrintestinais e TFG abaixo de 25 mL/min/1,73 m² são contraindicações ao seu uso.

Glitinidas

A repaglinida e a nateglinida são secretagogos de insulina, com eficácia semelhante entre si no controle glicêmico (LI et al., 2009), porém inferior a de agentes como metformina e sulfonilureias (BOLEN et al., 2007). Em relação às sulfonilureias, possuem ação mais rápida e mais breve, são mais eficazes no controle da glicemia pós-prandial, levando a menores taxas de hipoglicemia e menor ganho de peso (NATHAN et al., 2009).

As glitinidas podem ser utilizadas como monoterapia, em combinação com outras medicações orais (sem vantagem da associação com sulfonilureias) e com insulina (BLICKLE, 2006).

Os principais efeitos adversos são aumento de massa corporal e hipoglicemia (BLICKLE, 2006; NATHAN et al., 2009). Podem ser utilizadas em pacientes com perda de função renal, embora a segurança em indivíduos com TFG <30 mL/min/1,73 m² ainda não esteja estudada. A insuficiência hepática reduz o metabolismo destas medicações (BLICKLE, 2006).

Tiazolidinedionas

A pioglitazona, a tiazolidinediona disponível no mercado, atua através da ligação ao receptor nuclear PPAR com melhora da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (CHIARELLI e DI MARZIO, 2008). Uma vantagem é o baixo risco de hipoglicemia (BOLEN et al., 2007).

A pioglitazona possui efeito benéfico no perfil lipídico (redução de LDL e triglicerídeos, aumento de HDL) (BOLEN et al., 2007; CHIARELLI e DI MARZIO, 2008). Entretanto, suas desvantagens são aumento de massa corporal, retenção de líquido, insuficiência cardíaca e edema, principalmente em pacientes com uso concomitante de insulina, além de maior incidência de fraturas ósseas (BOLEN et al., 2007; CHIARELLI e DI MARZIO, 2008; DORMUTH et al., 2009; HOME et al., 2009; LOKE, SINGH e FURBERG, 2009).

A outra tiazolidinediona, a rosiglitazona, agora em uso restrito no mercado, foi associada a eventos isquêmicos cardiovasculares (NISSEN e WOLSKI, 2007) e ensaio clínico recente não demonstrou benefício cardiovascular, além de comprovar a maior incidência de insuficiência cardíaca e fraturas (HOME et al., 2009).

A pioglitazona foi associada à redução de 10% das complicações cardiovasculares, porém sem alcançar significância estatística (DORMANDY et al., 2005). Quanto à hepatotoxicidade, não há evidência de dano com estas medicações, porém recomenda-se avaliação das transaminases a cada 2 meses no primeiro ano de tratamento e, após, anualmente (CHIARELLI e DI MARZIO, 2008). As contraindicações são doença hepática ativa, insuficiência cardíaca, porém podem ser utilizadas em pacientes com insuficiência renal.

Em resumo, devido aos efeitos colaterais graves, estas medicações devem ser utilizadas com cautela e em pacientes sem edema ou insuficiência cardíaca prévia. Sua principal indicação é para aqueles pacientes com controle glicêmico inadequado com drogas como metformina e glibenclamida, e que não desejam iniciar insulino terapia.

Análogos do peptídeo GLP-1

Incretinas - GLP1 (glucagon-like peptide-1) e GIP (*glucose-dependent insulinotropic peptide*) - são hormônios liberados pelas células intestinais com a ingestão dos alimentos, cujo efeito resulta na maior secreção de insulina com a ingestão de glicose oral do que com a sua infusão parenteral. Além da maior secreção de insulina, o GLP1 reduz a hiperglucagonemia, retarda o esvaziamento gástrico, reduz o apetite, e possui possíveis propriedades anti-apoptóticas nas células B pancreáticas (TODD e BLOOM, 2007).

A exenatida é o análogo de GLP1 atualmente disponível para uso no Brasil, e pode ser utilizada em monoterapia, ou em associação com metformina, sulfonilureia e tiazolidinediona (TODD e BLOOM, 2007; GILBERT e PRATLEV, 2009). O FDA não recomenda o uso da liraglutida (dose única diária) até o momento, embora esta medicação tenha se mostrado mais eficaz no controle glicêmico e com menor taxa de efeitos adversos a curto prazo que a exenatida (BUSE et al., 2009). O taspoglutide (dose semanal) está sendo avaliado para liberação.

O efeito dos análogos de GLP1 ocorre principalmente na glicemia pós-prandial (redução da HbA1c em torno de 1%) e na perda de peso, em parte devido aos seus efeitos adversos gastrintestinais (AMORI, LAU e PITTAS, 2007; TODD e BLOOM, 2007; MONAMI, MARCHIONNI e MANNUCCI, 2009). Outra vantagem é a baixa incidência de hipoglicemias, que ocorrem predominantemente quando há associação com outras medicações (TODD e BLOOM, 2007; MONAMI, MARCHIONNI e MANNUCCI, 2009). Náusea é relatada em 40 a 50% dos pacientes e é causa frequente de descontinuação do tratamento, porém este efeito é transitório (TODD e BLOOM, 2007; GILBERT e PRATLEV, 2009). Relatos de caso de ocorrência de pancreatite em usuários de exenatida foram descritos, embora ainda sem comprovação causal com o fármaco (GILBERT e PRATLEV, 2009). Outras desvantagens são o uso subcutâneo e o alto custo desta medicação. As contraindicações para seu uso são hipersensibilidade à medicação, cetoacidose, doenças gastrintestinais sintomáticas e TFG abaixo de 30 mL/min (TODD e BLOOM, 2007).

Insulina

A insulina é indicada no tratamento de pacientes com DM 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 DM tipos 1 e 2. Todos os pacientes com DM 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 glicada (RANG et al. 2007).

A indicação do início de uso de insulina em pacientes com DM tipo 2 é a falha dos antidiabéticos orais e mudança do estilo de vida em atingir controle glicêmico satisfatório. Sintomas sistêmicos de descompensação (perda de peso, poliúria, polidipsia, e glicemia de jejum acima de 270 mg/dL), complicações cardiovasculares e infecções graves também necessitam de tratamento com insulino-terapia. As insulinas utilizadas atualmente são de origem humana ou análogos de insulina, e são classificadas pelo tempo de ação, conforme citado na Tabela 1 (página 39). Usualmente utiliza-se insulina de longa ação, na dose de 0,2 U/kg de peso em dose única noturna. Os ajustes são realizados a cada 2 a 3 dias de observação, com base na glicemia de jejum. Se o paciente não atingir as metas glicêmicas com uma única dose de insulina noturna, o passo seguinte é a insulinização plena, com doses múltiplas de insulina, a exemplo do que é realizado nos pacientes com DM 1. As insulinas pré-misturadas combinam em diferentes proporções insulinas basais e prandiais, porém seu uso não permite flexibilidade da dose utilizada. Entretanto, em pacientes com DM tipo 2 com falha da terapia oral, o uso de 2 doses de insulina pré-misturada foi superior à dose única de insulina basal para o controle glicêmico (HOLMAN et al., 2009).

O uso de análogos de insulina não apresenta vantagens evidentes sobre as insulinas humanas em pacientes com DM tipo 2, pois o controle glicêmico e a taxa total de hipoglicemias são semelhantes, com custo mais elevado (PLANK et al., 2005; UMPIERREZ et al., 2009). A vantagem teórica é a redução do número de hipoglicemias noturnas e a comodidade da aplicação, já que os análogos de ação

rápida podem ser administrados no momento da refeição (insulina regular: 30-40 minutos antes da refeição), e os de longa ação apenas uma vez ao dia (insulina NPH: 1 a 3 aplicações).

Os efeitos adversos da insulinoterapia são ganho de peso, hipoglicemia, e as reações cutâneas, como a lipoatrofia e a lipohipertrofia. Recentemente houve questionamento da segurança do uso da insulina glargina, já que estudos observacionais demonstraram associação com maior taxa de neoplasia nos usuários deste análogo em relação aos usuários de insulina humana (HEMKENS et al., 2009).

2.1.4 DIABETES MELITO EXPERIMENTAL

Tem-se estudado métodos para indução do diabetes experimental, tais como, pancreatectomia parcial ou total, o uso de hormônios anti-insulínicos, a exposição à hidro cortisona e lesões no sistema nervoso central. Porém a administração de agentes químicos B-citotóxicos como a aloxana e a estreptozotocina (REIS e ALCOLADO, 2005) consiste numa maneira eficiente para promover o DM tipo 1 e assim, torna-se possível o estudo de mecanismos fisiopatológicos, atividade hipoglicemiante e anti-diabetogênica de certos compostos.

Dessa forma, agentes diabetogênicos como o aloxano e estreptozotocina tem sido utilizados em estudos experimentais para indução ao DM, pois estas drogas têm a capacidade de reproduzirem em animais de laboratório o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem na doença naturalmente adquirida (MENDES e RAMOS, 1994). Ambos xenobióticos caracterizam-se por seu efeito tóxico seletivo às células das ilhotas de Langerhans do pâncreas (MORDES e ROSSINI, 1981; SZKUDELSKI, 2001).

Modelos animais com diabetes, que apresentem o *status* redox similar ao humano, são úteis para analisarmos possíveis mecanismos que estejam envolvidos na relação diabetes e estresse oxidativo. O diabetes experimental pode ser induzido por fármacos, manipulação cirúrgica ou genética em várias espécies de animais. A maioria dos experimentos é realizada em roedores, embora alguns estudos sejam realizados em animais maiores. O modelo murino é o mais usado em decorrência da disponibilidade de mais de 200 linhagens bem caracterizadas e da habilidade de deletar ou superexpressar genes específicos por meio da tecnologia dos nocaute e transgênicos (REES e ALCOLADO, 2005).

A estreptozotocina é uma glicosamina-nitrosureia comumente usada para produzir o diabetes. A droga é captada pelas células B pancreáticas que contêm transportadores de glicose GLUT 2, então, células produtoras de insulina que não expressam esse transportador são resistentes a estreptozotocina (STZ) (ELSNER et al., 2000).

Alguns mecanismos são propostos para a citotoxicidade produzida pela STZ. A alcalinização do DNA celular e subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase causam depleção rápida e letal de NAD nas células B pancreáticas, com subsequente redução no nível de ATP e posterior inibição da síntese e secreção da insulina (BENNETT e PEGG, 1981; BOLZAN e BIANCHI, 2002).

A estreptozotocina é um glicosídeo natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*. Este xenobiótico tem sido usado para induzir tanto o DM tipo 1 quanto o DM tipo 2, dependendo da concentração, dose e via de administração (NEGRI, 2005; SZKUDELSKI, 2001). Quando utilizada em animais, determina uma severa deficiência de insulina com quadro de hiperglicemia. Na dose de 160 a 250 mg/Kg, apresenta efeito citotóxico direto nas células beta dos animais, causando danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), como fragmentação e alquilação do mesmo, exaurindo a nicotina adenina dinucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo, dando início a morte das células B pancreáticas, através da depleção de energia. Duas horas após a injeção de STZ já se observa hiperglicemia devido à diminuição nos níveis de insulina no sangue. Cerca de seis horas depois, com a destruição das células B e concomitante liberação do conteúdo de insulina presente nas mesmas, ocorre hipoglicemia, com

consequente diminuição da glicose sanguínea. Finalmente, dias depois, a hiperglicemia se desenvolve e ocorre diminuição irreversível dos níveis de insulina no sangue (BENNETT e PEGG, 1981; BOLZAN e BIANCHI, 2002). Estas alterações na glicemia e insulinemia refletem as alterações causadas nas células beta. Em doses sub-diabetogênicas (40mg/kg) a STZ pode produzir insulite pancreática, ocasionando inflamação com morte progressiva das células beta levando ao quadro de diabetes tipo 1. Tratamentos com pequenas concentrações e em dias consecutivos culminarão com o aparecimento de lesões inflamatórias nas ilhotas através de reação imune mediada pelas células T (LEZEN, 2008).

Evidências indicam que os radicais livres podem ter um papel essencial no efeito diabetogênico da STZ (TAKASU, 1991). O estresse oxidativo pode ser avaliado por meio de atividade de enzimas envolvidas no balanço redox da célula, que incluem a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, as quais convertem radicais superóxido em peróxidos ou peróxidos em água e oxigênio. A conversão de peróxido de hidrogênio pela glutathione peroxidase ocorre concomitante com a oxidação da glutathione reduzida (GSH) para a forma oxidada (GSSG). O diabetes pode alterar a atividade dessas enzimas em vários tecidos (RAUSCHER, SANDERS e WATKINS, 2000). Compostos que podem ser modificados pela ação de radicais livres, como lipídios, proteínas e grupos sulfidrilas, são também usados como medidas indiretas do estresse oxidativo.

2.2 DIABETES MELITO E ESTRESSE OXIDATIVO

Em 1985, Sies (1985) definiu o estresse oxidativo como “um distúrbio no estado e equilíbrio dos sistemas pró-oxidantes/antioxidante em células intactas”. Embora essa definição clássica tenha sido útil no direcionamento de pesquisas por décadas, estudos recentes de intervenção com antioxidantes e marcadores do estresse oxidativo indicam que o estresse oxidativo é decorrente de uma “ruptura da sinalização e do controle redox” (JONES, 2006).

O fornecimento de energia para a realização de processos vitais aos organismos aeróbios depende de reações de oxidação. Essas reações geram radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), subprodutos considerados prejudiciais às células. Quando presentes em excesso, os radicais livres podem promover alterações em moléculas de DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos. A oxidação dessas biomoléculas pode levar à apoptose ou à lesão em tecidos associados ao desenvolvimento de diversas doenças, incluindo câncer, hepatopatias, diabetes e aterosclerose (FRANKEL, 2005; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2007).

As células desenvolvem um eficiente e sofisticado sistema de defesa antioxidante para controlar a formação desses radicais livres e limitar seus efeitos prejudiciais. No citoplasma, os principais mecanismos de defesa são enzimáticos, enquanto no plasma, pequenas moléculas respondem pela maior parte do poder antioxidante (FÖRSTERMANN, 2008). Quando esses mecanismos são esgotados por excesso de produção de radicais livres, ou quando tais mecanismos não são acessíveis ou perdem a eficiência para tamponar o efeito dessas espécies, ocorre o estresse oxidativo (LAURINDO, 2005).

Como 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 e RAO, 2002).

Atualmente, existe um crescente interesse no estudo da contribuição do estresse oxidativo para desenvolvimento das complicações em DM. 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 α -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 DM devem derivar do estresse oxidativo em tecidos catalisado pela descompartmentalização 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 3 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; BROWNLEE, 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⁺ 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⁺ e NADH/NAD⁺ 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 glutathiona redox (reciclagem de GSH) e NO-sintase (formação de óxido nítrico) (ROCHA et al., 2006).

3 - Ativação de isoformas de proteína quinase C: 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 quinase C (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 A₂ 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 3 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 e colaboradores (1996) provaram que as espécies reativas de oxigênio (ERO's) conduzem a um dano nas células B pancreáticas por meio da indução da apoptose e supressão da biossíntese da insulina. As células β 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, a integridade do sistema antioxidante é um determinante importante na suscetibilidade ao estresse oxidativo (EL-ALFY, AHMED E FATANI, 2005).

2.2.1 COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELITO

Conforme citado anteriormente, vários mecanismos são propostos para explicar o dano celular induzido pela hiperglicemia. Os principais incluem o aumento da ativação da via dos polióis, o aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), o aumento da ativação da proteína quinase C e da hexosamina.

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 glicação 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 DM 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 sensitivo motora 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 a hiperglicemia 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).

2.2.2 O USO DE ANTIOXIDANTES NA PREVENÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELITO

Para evitar o excesso de produção de radicais livres, bem como neutralizar os já formados, o organismo lança mão dos antioxidantes. Estes são definidos como qualquer tipo de substância que, quando presente em baixa concentração, em comparação com as de um substrato oxidável, retarda, evita danos oxidativos ou remove a molécula em questão (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes envolvem tanto as defesas enzimáticas quanto as não-enzimáticas. Dentre essas últimas, destacam-se as vitaminas A, C e E, glutathione, ácido α -lipoico, carotenoides, elementos traço, como zinco e selênio, coenzima Q10, além dos metabólitos especiais de vegetais, como fenóis e flavonoides. Há ainda cofatores importantes a essa ação antioxidante, destacando-se o ácido fólico, ácido úrico, albumina e vitaminas do complexo B (VEGA-LOPEZ, DEVARAJ e JIALAI, 2004).

Esses antioxidantes estão presentes nos tecidos e apresentam uma efetiva ação terapêutica, tanto no tratamento da resistência à insulina quanto nas complicações observadas no DM tipo 2. Alguns estudos, apontam o ácido α -lipoico e a vitamina E, além da vitamina C e glutathione, como antioxidantes eficazes desta terapia (RUHE e McDONALD, 2001; HENRIKSEN, 2002).

2.3 A UTILIZAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS HIPOGLICEMIANTES

Sabe-se que 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 DM. No Brasil, encontram-se diversas plantas com ação hipoglicemiante oferecendo, assim, potencial para a pesquisa científica que valide o seu uso com eficácia e segurança (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 DM (ABDEL-BARRY, ABDEL-HASSAN e AL-HAKIEM, 1997). A pesquisa de espécies com potencial hipoglicemiante conhecidas na medicina popular, almeja a comprovação dos seus 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).

Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um fármaco novo é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser: compostos sintéticos, produtos naturais ou química combinatória. Entre estas possibilidades, os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química (STREGE, 1999).

O Brasil é um forte candidato a tornar-se um importante produtor/exportador de extratos vegetais com atividade biológica por incluir-se entre os países de maior biodiversidade mundial. É um país que abriga cerca de 50 mil espécies de plantas superiores distribuídas em grandes biomassas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Floresta Subtropical (VIEIRA et al., 2002).

São inúmeras as atividades funcionais e farmacológicas atribuídas aos extratos vegetais e princípios ativos de plantas nativas e/ou adaptáveis ao cultivo brasileiro, destacando-se as atividades antioxidante, antitumoral, hipoglicemiante, anti-HIV, bactericida, fungicida, hipocolesterolemia e antimálica. Os extratos vegetais têm importante participação nas composições de produtos e suplementos alimentares, bem como em cosméticos e fármacos. Como as pesquisas com extratos vegetais crescem significativamente pelas inúmeras aplicações das substâncias ativas, a busca por tecnologias que permitam a obtenção destes produtos tem grande importância (LEAL et al., 2003).

A fitoterapia é um método que pode ser utilizado e indicado, como uma fonte de fácil aquisição e custo relativamente reduzido, para o tratamento de enfermidades, dentre elas o diabetes melito. 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 procura de novas alternativas para o tratamento do diabetes torna-se, portanto, imprescindível. Atualmente, estudos sobre novas drogas hipoglicemiantes vêm sendo realizados, com enfoque especial para as plantas medicinais usadas na medicina popular, pois dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998; BARBOSA-FILHO et al., 2005). Um exemplo é a planta *Galega officinalis*, que levou ao desenvolvimento da droga hipoglicemiante oral, metformina (NOEL et al., 1997).

Como consequência do aumento da utilização das plantas medicinais, diversos setores mercadológicos vêm produzindo produtos à base de espécies vegetais, em diversas formas farmacêuticas. Destacando por sua facilidade de administração e estabilidade, as formas farmacêuticas orais, bastante aplicáveis à incorporação de extratos vegetais. A utilização de agentes de viscosidade, tais como carboximetilcelulose, auxiliam no controle de liberação do fármaco, aumentando o tempo de contato entre o extrato administrado e o local de absorção deste (FERREIRA, 2002).

2.3.1 PRODUTOS NATURAIS HIPOGLICEMIANTES E PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO

São diversos os mecanismos de ação pelos quais as plantas reduzem a glicemia. Dentre eles destacam-se o aumento da liberação de insulina através do estímulo de células B pancreáticas, aumento do número e da sensibilidade do receptor de insulina, redução do consumo de glicogênio, aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos, eliminação de radicais livres, resistência à peroxidação lipídica, 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 et al., 2003; LI et al., 2004).

Diversas substâncias podem ser extraídas de plantas e atuarem na redução da glicemia. Tais substâncias incluem uma grande variedade de classes químicas indicando 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 α -amilase e α -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, QUANT e RAMAN, 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-GLT 1 (KOBAYASHI et al., 2000b).

A capacidade de regeneração das células B 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 flavonoides, 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 flavonoides presentes no extrato hidroalcoólico de *B. variegata* também foram registrados como hipoglicemiantes em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.

Compostos fenólicos

Compostos fenólicos presentes em diversas espécies de plantas tem sido estudados em variados tipos de atividades farmacológicas e antinutricionais. Isso se deve ao fato desses compostos 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. Estes trabalhos enfrentam muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma considerável variedade de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas,

flavonoides, taninos e ligninas), eles são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos, e susceptíveis à ação de enzimas (KING e YOUNG, 1999).

Dentro do grupo dos polifenóis, os flavonoides constituem uma importante classe de ocorrência natural e frequentemente encontrados em várias plantas, frutas e vegetais. São conhecidos mais de 4200 flavonoides, 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).

Recentemente, as aplicações terapêuticas dos flavonoides no tratamento e prevenção de doenças em humanos são demonstradas em vários estudos. Entre essas aplicações destacam-se o seu 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).

Efeitos antidiabéticos têm sido demonstrados para alguns compostos polifenólicos. Investigações do mecanismo de ação desse tipo de compostos estão em desenvolvimento, citando-se como exemplos de flavonoides com ação anti-hiperglicêmica comprovados a (-)-epicatequina, que protege as ilhotas de Langerhans e promove a regeneração das células B nas ilhotas, estimula a liberação de insulina e normaliza os níveis de glicose sanguínea; a silimarina, com propriedades antioxidantes, atua protegendo as células B 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 B; 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, aumentado 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 anti-inflamatória, 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 e 2000).

Os ácidos fenólicos, por sua vez, são indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças, como diabetes (BRAVO, 1998; FERGUSON e HARRIS, 1999). Estes são divididos em dois grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzoicos, que possuem 7 átomos de carbono e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem 9 átomos de carbono, sendo 7 os mais comumente encontrados no reino vegetal (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 cafeico, o qual, associado a um álcool ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

2.3.2 A ESPÉCIE *Cecropia pachystachya* Trécul

Muitas espécies de plantas têm sido testadas para tratar os sintomas do diabetes melito. Entre essas espécies está *Cecropia pachystachya* Trécul (URTICACEAE), uma planta nativa do Brasil, cujos nomes populares são embaúba, imbaíba, umbaúba, árvore-de-preguiça, barbeira, torém (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007).

Trata-se de uma espécie arbórea (Figura 1, página 61), perenifólia, que ocorre desde o Rio Grande do Norte até Santa Catarina, nos cerrados, florestas estacionais e formações do complexo atlântico. A altura da árvore varia de 20 a 35 metros de altura, e o tronco de 15 a 20 centímetros de diâmetro, sendo ramificado apenas na

região superior. Possui folhas simples, palmatífidas, com incisões que às vezes atingem o pecíolo de 9 a 13 segmentos. A face superior é áspera e a inferior apresenta uma densa camada de pêlos esbranquiçados (Figura 2, página 62). A espécie *C. pachystachya* é dioica, com inflorescências masculinas ramificadas que possuem segmentos organizados aos pares, mais ou menos pêndulas. As inflorescências femininas ocorrem também aos pares, em pêndulos. Suas infrutescências apresentam-se em espiga, com sementes pequenas, de 1,5 a 2,5 mm, que são utilizados como alimento para diversos grupos de aves e morcegos (da SILVA, 2008).



Figura 1: Árvore de *Cecropia pachystachya* Trécul

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/embauba/cecropiapachystachya>

No Brasil, as plantas do gênero *Cecropia* têm sido utilizadas em doenças do aparelho respiratório, tais como asma, bronquite, tosse, coqueluche e pneumonia. Há também relatos de seu uso na medicina popular como auxiliar no tratamento do DM, doença de Parkinson, perturbações do fígado e hipertensão arterial (CONSOLINI et al., 2006; ARAGÃO et al., 2010). Além disso, há relatos de que essa espécie aumenta a energia do músculo cardíaco sem multiplicar os batimentos do coração, sendo considerada cardiotônica. O suco obtido da raiz é usado, ainda, como diurético (REYES, 2004).



Figura 2: Folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/new/embauba/cecropiapachystachya>

Na Colômbia, *Cecropia* sp é também considerada efetiva 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 é ainda 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 gonorreia. No México, essas plantas são utilizadas popularmente para o tratamento do DM, 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).

Algumas das indicações acima citadas já foram inclusive incorporadas no Formulário Farmacêutico Brasileiro, incluindo o seu uso no tratamento de bronquite, dispneia e asma (COIMBRA, 1958). O xarope de *Cecropia hololeuca* foi citado na primeira Farmacopeia Brasileira. Já a infusão a 5% ou decocção de *Cecropia pachystachya* foi incluída na Farmacopeia Nacional Argentina, em 1978, devido ao seu extensivo uso popular (ALONSO, 1998).

Vários estudos farmacológicos têm sido desenvolvidos para explicar e confirmar alguns dos muitos usos de plantas do gênero *Cecropia* na medicina popular. Andrade-Cetto e Wiedenfeld (2001) compararam o efeito hipoglicemiante dos extratos aquoso e butanólico de folhas de *Cecropia obtusifolia* ao efeito produzido pelo hipoglicemiante oral glibenclamida. Nesse artigo, os autores sugerem um efeito semelhante ao produzido pela glibenclamida em ambos os extratos avaliados. Os autores atribuem ainda o efeito hipoglicemiante à presença de dois componentes identificados nesse estudo – isoorientina e ácido clorogênico. Esses componentes foram posteriormente identificados como inibidores de α -glicosidase, uma enzima que apresenta papel fundamental na absorção intestinal de monossacarídeos (ANDRADE-CETTO, BECERRA-JIMÉNEZ, CÁRDENAS-VÁSQUEZ, 2008). Revilla-Monsalve et al. (2007) acrescentam que o efeito hipoglicemiante do extrato aquoso das folhas de *C. obtusifolia* não deve ser atribuído a um estímulo na secreção de insulina.

O efeito hipoglicemiante dos extratos aquoso e butanólico das folhas de *Cecropia obtusifolia* e *Cecropia peltata* também foi atribuído à inibição da enzima glicose-6-fosfatase, importante na liberação hepática de glicose, principalmente nos estados de jejum (ANDRADE-CETTO e VÁSQUEZ, 2010).

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 traqueia 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 e colaboradores, 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 anti-inflamatória, analgésica e efeito depressor central (PÉREZ-GUERRERO et al., 2001), além de sua atividade antioxidante (Silva et al., 2007; 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 *C. pachystachya* em cães e coelhos, sugerindo sua atividade broncodilatadora e toxicidade cardíaca. Foi demonstrado, ainda, 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. Um potente efeito sedativo, comparado ao Diazepam® 10mg/kg também foi observado em extratos aquosos de folhas de *C.*

pachystachya, sendo este relacionado à sua utilização para o tratamento da tosse e asma (Consolini et al., 2006). Consolini e Migliori, 2005, constataram atividade diurética em ratos e Velázquez et al. (2003) e Aragão et al. (2010) observaram a propriedade antioxidante *in vitro* de *C. pachystachya*.

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

Aragão *et al* (2010) demonstraram a atividade hipoglicemiante do extrato metanólico dessa espécie em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano, em um período de tratamento de 42 dias. O efeito hipoglicemiante apresentado por essa espécie foi atribuído, em parte, à presença de ácido clorogênico e dos flavonoides glicosilados orientina e isoorientina.

O ácido clorogênico é encontrado em uma gama de alimentos de origem vegetal (de MARIA e MOREIRA, 2004). A estrutura química (Figura 3, página 65) 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). Esse composto foi identificado como um inibidor específico de glicose-6-fosfato translocase (IVORRA, PAYÁ e VILLAR., 1989; SCHWAB et al., 2001).

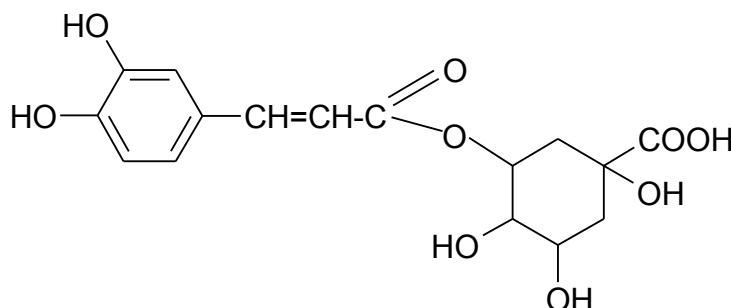


Figura 3: Estrutura química do ácido clorogênico. Fonte: Andrade-Cetto e Wiedenfeld, 2001

Além disso, foram identificados dois flavonoides glicosilados, orientina e isoorientina (Figura 4, página 66), aos quais foi atribuída a capacidade de reduzir a circulação de radicais livres. Segundo estudos, isso levaria a uma redução do risco de desenvolvimento de complicações diabéticas muitas vezes relacionadas a uma elevada concentração dessas espécies reativas no organismo (ANDRADE-CETTO e HEINRICH, 2005, ARAGÃO et al., 2010). 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).

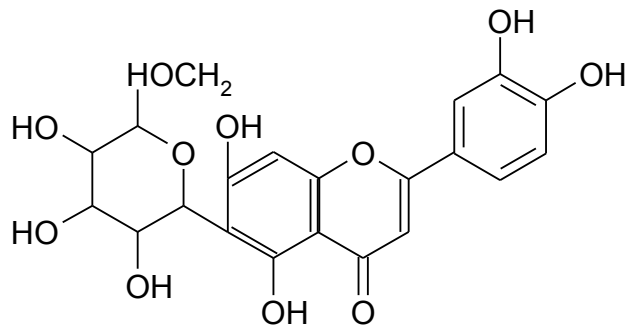


Figura 4: Estrutura do flavonoide glicosilado isoorientina. Fonte: ZERAIK et al., 2011

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

2.3.3 O USO DE FITOTERÁPICOS COMO ALTERNATIVA NO TRATAMENTO DOS SINTOMAS DO DIABETES MELITO

A partir de uma perspectiva histórica, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de doenças começaram com o uso de plantas medicinais. Métodos populares de cura, praticados pelos povos da região do Mediterrâneo e do Oriente, encontraram expressão no primeiro compêndio de plantas medicinais europeu. Este compêndio trazia monografias constituídas tipicamente por uma ilustração da planta medicinal, nome da espécie e seus sinônimos, além de sua ação, relacionada com grau de potência e propriedade, e indicações para seu uso (SCHULZ, HÄNSEL e TYLER, 2002).

Com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). Alguns objetivos específicos deste Decreto são o de promover a pesquisa, o desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos nas diversas fases da cadeia produtiva promovendo o desenvolvimento sustentável, bem como o fortalecimento da indústria farmacêutica nacional neste campo. Algumas diretrizes do Decreto no 5.813 visam promover a formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos, além de fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira. Diante destas medidas, observa-se a importância que a área de produtos naturais está conquistando na política e no mercado brasileiros (LEAL et al., 2003).

Os fitoterápicos são produtos medicinais cujos componentes farmacológicos ativos consistem exclusivamente em materiais vegetais (KELLER, 1996). Geralmente tratam-se de formulações de componentes múltiplos e composição complexa que, além de seus compostos ativos principais, contem componentes considerados secundários. Os compostos ativos principais são responsáveis pelo tipo de efeito produzido, enquanto que os componentes secundários que auxiliam e modificam esse efeito, influenciando na sua estabilidade e biodisponibilidade (SCHULZ, HÄNSEL e TYLER, 2002).

Há muitas formas nas quais uma substância ativa pode disponibilizada visando o tratamento eficaz e conveniente de uma doença. Dentre os fatores considerados, antes que um fitoterápico seja formulado em uma ou mais formas farmacêuticas, estão os interesses terapêutico, como a natureza da doença, a maneira pela qual ela é tratada (local ou de ação sistêmica), idade e estado presumível do paciente (ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007).

O estudo das formas farmacêuticas, a escolha da via de administração, as condições físicas, idade do paciente e a natureza da doença, são fatores importantes que devem ser observados no desenvolvimento de um medicamento (ALLEN, 2000).

De uma maneira geral, medicamentos de uso sistêmico e administração oral são preparados na forma de comprimidos ou cápsulas por serem facilmente manipulados pelo próprio paciente, facilitando a auto-administração. Porém, a idade do paciente desempenha um papel importante no desenvolvimento da forma farmacêutica adequada. Em crianças menores de 5 anos, por exemplo, os líquidos orais são preferíveis às formas sólidas. Por outro lado, pacientes idosos geralmente fazem uso de diversos medicamentos. Diferenças no tamanho, forma e cor das formulações farmacêuticas auxiliam na identificação do medicamento, reduzindo os erros no uso dessas medicações (ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007).

As formas farmacêuticas líquidas administradas por via oral são as formas em que o fármaco se encontra disponível, para ser absorvido, desde que totalmente dissolvido no meio, pois não ocorre a etapa de dissolução verificada em relação aos comprimidos e cápsulas (BURI, 1999).

Nesse contexto, a utilização de formas farmacêuticas líquidas tem merecido destaque, tanto pela sua facilidade de administração pelas mais variadas idades, quanto pela possibilidade de incorporação de mais diversificados tipos de compostos ativos. As formas farmacêuticas líquidas incluem tinturas, gliceritos e produtos relacionados, xaropes, óleos medicinais, alcoolaturas e sucos de plantas (SCHULZ, HÄNSEL e TYLER, 2002).

Conforme a característica do meio líquido, classificaram-se as formas farmacêuticas como: soluções, xaropes, elixires, espíritos, águas aromáticas, tinturas e extratos fluidos (PRISTA, ALVES e POPOVICH, 1992; ANSEL, ALLEN e POPOVICH, 1995; ANSEL, ALLEN e POPOVICH, 2001; LACHMAN, LIEBERMAN e KANING, 2001). Estas formas farmacêuticas de uso oral, quando ingeridas despertam um conjunto de sensações olfato-gustativas, textura e visuais, que definem o paladar de cada produto.

Conhecidos pelos médicos árabes antigos, os xaropes medicinais foram introduzidos na medicina europeia no início da Idade Média. A palavra “xarope” vem do árabe *sinab*, *schrab* ou *scherbet*, que significa “uma bebida feita de um suco doce açucarado”. De fato, xaropes são preparações aquosas concentradas de açúcar ou um substituto, com ou sem adição de fármacos e flavorizantes. (SCHULZ, HÄNSEL e TYLER, 2002; ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007).

Qualquer substância ativa solúvel em água e estável em meio aquoso pode ser acrescentada a um xarope. Porém, deve-se estar seguro da compatibilidade entre essa substância e os demais componentes da formulação (ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007). Nesse contexto, a adição de produtos de origem vegetal deve considerar tanto as características de seus principais compostos ativos quanto a forma de extração desses compostos.

Os xaropes podem ser de dois tipos, os não medicamentosos e os medicamentosos. Os primeiros, também denominados veículos flavorizados são utilizados para incorporação de substâncias ativas durante a manipulação de medicamentos ou na preparação de uma fórmula padrão. Devido à incapacidade de algumas crianças e idosos na deglutição de formas farmacêuticas sólidas, é bastante comum serem solicitadas a preparação de uma forma líquida oral de um medicamento disponível apenas na forma sólida de comprimidos ou cápsulas.

Nesses casos, deve-se levar em consideração a solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade do fármaco a ser acrescentado ao xarope (ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007). Essa parece ser uma alternativa à maior adesão a um tratamento com fitoterápicos, substâncias de sabor desagradável quando ingeridas na forma de extrato puro.

Já os xaropes medicamentosos são preparados a partir de matérias-primas brutas, ou seja, por meio da combinação de cada um dos componentes individuais da formulação, tais como sacarose ou substitutos não açucarados, água purificada, flavorizantes, corante, fármaco e outras substâncias necessárias e desejáveis. De uma maneira geral, os xaropes medicamentosos são empregados pelo valor terapêutico da substância ativa presente (ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007). Os fitoterápicos podem ser preparados na forma de xaropes medicamentosos. Nesse caso, durante a formulação os fitoterápicos são acrescentados como um fármaco, fazendo parte de um dos constituintes desse xarope.

A maioria dos xaropes contém açúcar ou um substituto do açúcar, utilizado para edulcorar e aumentar a viscosidade, além de conservantes, flavorizantes e corantes. Da mesma forma, muitos xaropes contém, ainda, solventes especiais, solubilizantes, espessantes ou estabilizantes que garantem a integridade do produto por um período de tempo considerável. Nesse aspecto, deve-se levar em consideração, principalmente, o conteúdo do agente de viscosidade. Este deve ser essencial para aumentar o prazo de validade do fitoterápico, impedindo o crescimento bacteriano, sem, contudo, alterar a biodisponibilidade da substância ativa. O crescimento bacteriano é retardado pela viscosidade dessa formulação, uma vez que, em soluções saturadas de elevada viscosidade, microrganismos tem sua proliferação reduzida pela ausência de disponibilidade da água livre. Por outro lado, essa viscosidade deve ser suficiente para que a substância ativa seja completamente liberada nos seus locais de absorção no interior dos organismos tratados (SCHULZ, HÄNSEL e TYLER, 2002; ALLEN Jr, POPOVICH e ANSEL, 2007).

No preparo de xaropes uma das características mais importantes é a manutenção de sua elevada viscosidade. Essa viscosidade tem como finalidade melhorar o paladar e melhorar o escoamento. Em alguns casos, verifica-se que soluções muito viscosas retardam a absorção de um fármaco. Para as soluções verdadeiras, a viscosidade pode ter influência sobre a velocidade de disponibilização do princípio ativo.

Obtém-se um aumento da viscosidade em soluções (macroviscosidade), adicionando polímeros (que em muitos casos podem alterar a absorção do fármaco) e adicionando solventes mais viscosos que a água (microviscosidade) como a glicerina ou propilenoglicol (BURI, 1999).

Hidrocoloides, gomas e polímeros solúveis em água são algumas das designações para materiais que apresentam a propriedade de aumentar a viscosidade ou gelificar sistemas aquosos (GLICKSMAN, 1980; PRISTA, ALVES e POPOVICH, 1992). Pode-se definir, também, hidrocoloide como o material que, empregado em um meio, confere-lhe uma viscosidade ou consistência desejada, ou ainda, estabiliza as fases de um sistema, como emulsão, suspensão ou espuma (PRISTA, ALVES e POPOVICH, 1992; ANSEL, ALLEN e POPOVICH, 1995).

Os polímeros que formam os hidrocoloides são, na sua maioria, polissacarídeos e são chamados de polímeros naturais, como por exemplo gomas, derivados de celulose e alginatos. Outros, são obtidos por síntese química e são chamados de polímeros artificiais como por exemplo os polímeros carboxivinílicos (carbômeros).

A celulose é um dos mais populares e abundantes dos biopolímeros naturais, é renovável e biodegradável, o que faz com que tenha as mais diversas utilizações. A celulose é um polímero linear que possui grupos hidroxilas (um grupo primário e dois grupos secundários por unidade monomérica de glicose) e como qualquer composto que contém grupamentos hidroxila, pode sofrer diversas reações, entre elas: adição, substituição, nitração, acetilação, esterificação e oxidação, utilizadas para preparar seus derivados. A natureza química, quantidade e distribuição dos grupos substituintes nos derivados da celulose governam propriedades como a solubilidade, estabilidade térmica, estabilização coloidal, atividade de superfície, termosplasticidade, características do filme e biodegradação, dentre outros

(SHALABY e SHAH, 1991).

Muitos polissacarídeos, tais como a celulose, galactomananas, carboximetilcelulose (CMC) e a quitosana, são agentes de adsorção usados em processos industriais e na remediação, especialmente, devido à facilidade de obtenção, à grande produção mundial e ao seu custo acessível aos laboratórios de pesquisa e indústrias (CMC, 25 reais/kg e quitosana, 45 reais/kg, para materiais grau analítico e 6 reais/kg e 12 reais/kg, para os materiais comerciais, respectivamente) (GECOL, ERGICAN e MIAKATSINDILA, 2005; SHALABY e SHAH, 1991).

A carboximetilcelulose de sódio (CMC) foi o biopolímero utilizado neste trabalho. Ela é um derivado da celulose, solúvel em água e que possui uma estrutura linear que consiste em unidades repetidas de *D*-glicose, ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) e substituídas por grupos carboximéticos (PIGMAN e HORTON, 1970). A CMC tem sido amplamente utilizada em formulações de uso oral, cremes dentais, espessantes de sorvetes e outros produtos alimentícios, na formulação de cosméticos e na impermeabilização de cimentos, entre outros (UENO et al., 2007 ; HARA et al., 2004). Sua ampla utilização pode ser associada ao fato de que é um produto atóxico, não carcinogênico e biocompatível (UENO et al., 2007; SHALABY e SHAH, 1991). Ela é comercializada em 3 graus diferentes de viscosidade, baixa, média e alta.

Vários graus de carboximetilcelulose sódica são comercializados e proporcionam diferentes viscosidades quando dispersas em soluções com pH que varia entre 6-8,5 em dispersões a 1% (PRISTA, ALVES e POPOVICH 1992; LABA, 1993; WADE e WELLER, 1994; ALLEN, 2000). Verificou-se que a carboximetilcelulose sódica apresenta estabilidade em pH entre 2-10. As soluções geralmente exibem um máximo de viscosidade e estabilidade em pH 7-9. (WADE e WELLER, 1994).

Em relação a toxicidade deste polímero quanto a administração oral, não encontrou-se dados, apenas apresentou toxicidade em formulações parenterais e em altas concentrações obteve-se um efeito laxativo. É importante salientar que este polímero em 1990 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para formulações de uso oral entre outras (WADE e WELLER, 1994).

Nesse contexto, o uso de formulações farmacêuticas líquidas, em especial de xaropes medicamentosos parece ser uma alternativa viável para a manipulação de novos fitoterápicos a serem utilizados no tratamento de diversas doenças, inclusive do DM.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos com *Cecropia pachystachya* Trécul em ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina, visando seu uso como adjuvante no tratamento do diabetes melito.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Com extratos das folhas de *Cecropia pachystachya*

- Preparar o extrato metanólico (EM) das folhas de *Cecropia pachystachya* por maceração estática;
- Particionar o extrato metanólico em ordem crescente de polaridade, utilizando hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol;
- Avaliar a atividade hipoglicemiante das partições hexânica, diclorometânica, em acetato de etila, butanólica e hidro-alcoólica;
- Preparar o extrato em acetato de etila (EAE) da folhas de *Cecropia pachystachya* por maceração estática;
- Estabelecer e padronizar uma metodologia analítica para a identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do ácido clorogênico e dos flavonoides isoorientina e orientina presentes nos dois extratos a fim de utilizá-los como marcadores químicos;

- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* dos extratos pelos ensaios de DPPH, poder de redução e TBARS;
- Avaliar a atividade hipoglicemiante de EM e EAE em ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- Avaliar a evolução do tratamento com os extratos analisando a massa corporal e consumos de água e ração durante o tratamento.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* dos extratos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais;
- Determinar a concentração de glicogênio hepático e muscular e a concentração sérica de hemoglobina glicada e frutossamina, insulina e glicose-6-fosfatase;
- Avaliar o efeito dos extratos sobre os marcadores dos metabolismos lipídico (colesterol total e frações, triglicérides) e proteico (proteínas totais e frações);
- Avaliar o potencial toxicológico dos extratos através das dosagens dos níveis de bilirrubina e enzimas que refletem as funções hepática (fosfatase alcalina, ALT, AST, GGT) e renal (ureia, creatinina);
- Realizar análise histológica do pâncreas, coração, fígado e rim de cada animal submetido ao tratamento;
- Desenvolver uma formulação farmacêutica (FF) com o extrato padronizado que apresentar maior efeito hipoglicemiante (EAE)

3.2.2 Com a formulação farmacêutica contendo o extrato padronizado em acetato de etila

- Avaliar sua atividade hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos com estreptozotocina;
- Determinar a concentração de glicogênio hepático e muscular e a concentração de hemoglobina glicada e frutossamina, insulina e glicose-6-fosfatase;
- Avaliar seu efeito sobre os marcadores dos metabolismos lipídico (colesterol total e frações, triglicérides) e proteico (proteínas totais e frações);
- Avaliar seu potencial toxicológico através das dosagens dos níveis de bilirrubina e enzimas que refletem as funções hepática (fosfatase alcalina, ALT, AST, GGT) e renal (ureia, creatinina);
- Realizar a análise histológica do pâncreas, coração, fígado e rim de cada animal submetido ao tratamento;
- Avaliar seu efeito após a interrupção do tratamento em animais diabéticos e normais;
- Avaliar o efeito protetor do seu pré-tratamento na indução com estreptozotocina;
- Avaliar a toxicidade aguda de FF em ratos machos e fêmeas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Cecropia pachystachya* Trécul foram coletadas em dezembro de 2009 e janeiro de 2011. A planta foi identificada pelo Dr. Ricardo Montiane 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.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS E PARTIÇÕES

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 (3 kg). Parte deste material seco (1,5 kg) foi extraído por maceração estática com metanol conforme descrito por Aragão e colaboradores (2010).

Aproximadamente 100 g do extrato metanólico, após remoção do solvente, foram ressuspensos em metanol:água (8:2) e, em seguida, procedeu-se ao particionamento com solventes de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e n-Butanol.

O restante do material vegetal seco (1,5 kg) foi previamente desengordurado em hexano por 24 horas e, posteriormente, extraído por maceração estática com acetato de etila em 3 vezes de 48 horas cada. A Figura 5 (página 78) esquematiza o preparo do extrato metanólico (EM) e do extrato em acetato de etila (EAE).

Em todas as etapas de preparo, os solventes foram evaporados e os extratos e partições secos foram pesados e mantidos sobre refrigeração até o momento da realização dos testes biológicos.

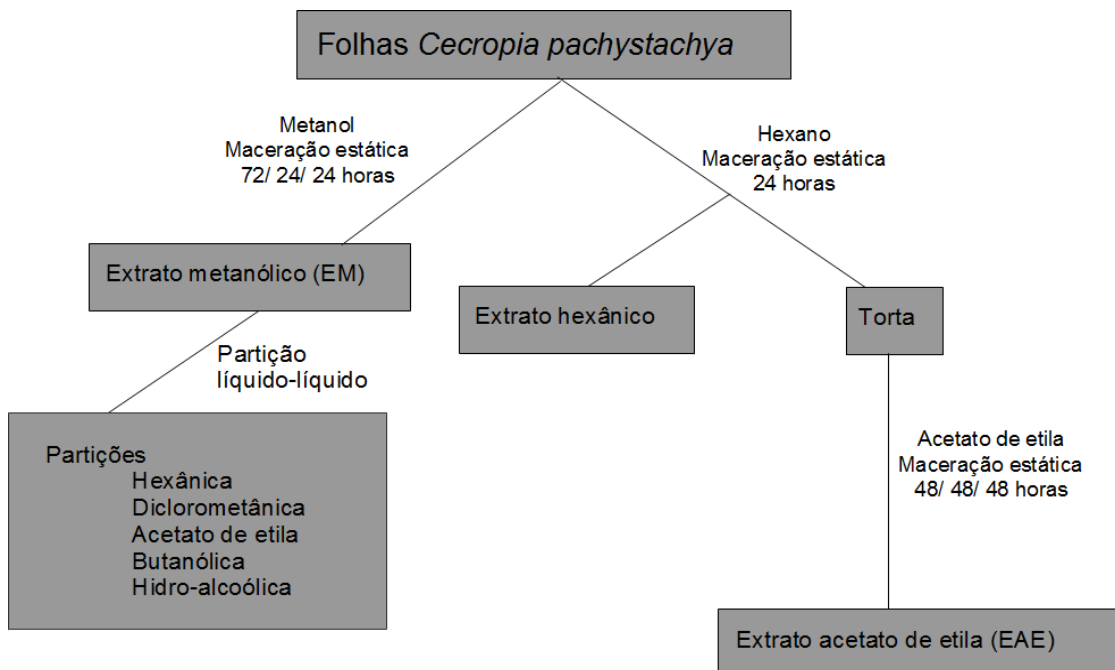


Figura 5: Esquema de preparo do extrato metanólico das folhas de *Cecropia pachystachya* e de suas partições, e preparo do extrato em acetato de etila das folhas de *Cecropia pachystachya*

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS MARCADORES MOLECULARES DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya*

4.3.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para determinar o perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* 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 dos solventes A (água, pH 4,0 ajustado com H₃PO₄) e B (acetonitrila, pH 4,0 ajustado com H₃PO₄) variando na seguinte proporção: 0-15 minutos, 7,5-15% de B e de 15-30 minutos, 16% B. O fluxo foi 1 mL/min. Após 30 minutos, o programa de eluição retornou à condição inicial; o volume de injeção foi de 20µL, na concentração de 1 mg/mL para todas as amostras analisadas. A temperatura foi mantida a 25° C durante a análise. A detecção foi feita em 210, 230, 254 e 280 nm. 3 padrões, identificados previamente no gênero *Cecropia*, ácido clorogênico, isoorientina e orientina foram utilizados como marcadores moleculares no processo de padronização dos extratos. Todas as amostras foram diluídas em acetonitrila: água (7,5:92,5%, pH 4,0 ajustado com H₃PO₄).

4.3.2 ANÁLISE QUANTITATIVA

As concentrações de ácido clorogênico, isoorientina e orientina nos extratos metanólico e em acetato de etila foram avaliadas pelo método de padrão externo. Foram utilizadas soluções estoques com concentrações crescentes (31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$). Cada determinação foi realizada em triplicata.

4.3.3 PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DA ANÁLISE QUANTITATIVA

Os ensaios de validação foram baseados na Resolução RE 899/2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2003) que determina o "guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos".

No estudo da validação do método analítico de padronização dos extratos metanólico e em acetato de etila foram avaliados os parâmetros de especificidade linearidade, sensibilidade e precisão.

A especificidade é a capacidade de um método em discriminar entre o analito em estudo e outros componentes na amostra. A especificidade do método de CLAE é demonstrada pela separação dos analitos em outros componentes potenciais, tais como impurezas, produtos de degradação, ou excipientes (DONG, 2006). Neste estudo, a especificidade foi demonstrada efetuando-se uma corrida de um branco processual, em que 2 mL de metanol, foram transferidos para um balão volumétrico apropriado e diluídos para 100 mL com a fase móvel (solução B). Além disso, a separação entre os picos e assimetria apresentada por cada um deles foi determinada por análise dos cromatogramas da solução padrão e a solução da amostra.

A linearidade da curva de calibração para o ácido clorogênico, isoorientina e orientina foi estabelecida pelo método do padrão externo. Soluções padrão estoque na qual as substâncias a uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ foram dissolvidas com metanol obtendo-se concentrações de 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Três determinações foram realizadas para cada concentração. As curvas de calibração foram obtidas através da representação gráfica da área do pico de cada composto versus a concentração das soluções padrão. Os parâmetros estatísticos da equação da curva de calibração e coeficiente de correlação foram calculados por análise de regressão linear.

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados a partir das curvas de calibração dos padrões moleculares. LOD foi calculado de acordo com a expressão $\text{DP} \times 3 / \text{IC}$, em que o DP é o desvio padrão da resposta e IC é a inclinação da curva de calibração. LOQ foi criado usando a expressão $\text{DP} \times 10 / \text{IC}$.

A repetibilidade (intra-dia) do método foi avaliada. As soluções-padrão foram analisadas em 3 concentrações: 31,25; 62,5; 125 e 250 para o ácido clorogênico; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ para isoorientina e orientina. 3 determinações foram realizadas para cada solução. O desvio padrão relativo (RSD,%) dentro das medições das concentrações de ácido clorogênico, isoorientina e orientina e foi usado para avaliar a reprodutibilidade.

4.4 ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya*

4.4.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

Foram utilizadas três metodologias para se avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos: o método de sequestro de radicais livres (método DPPH, GOVINDARAJAN et al., 2003), poder de redução (OYAZU, 1986) e análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KANIAS, WONG e ACKER, 2007).

O método de Brand-Williams (GOVINDARAJAN et al., 2003) tem por base a redução do radical 2,2'-difeníl-1-picrihidrazil (DPPH), o qual apresenta um máximo de absorção a 517 nm. Ao fixar um H⁺, abstraído do 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 de cada extrato 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) em espectrofotômetro a 517 nm. De posse destes valores foi calculada a porcentagem (%) de inibição da amostra da seguinte forma:

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

Foi calculado o CI₅₀, 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 CI₅₀, maior a atividade antioxidante do composto. Rutina e quercetina foram utilizados como controle positivo.

O poder de redução da amostra foi determinado pelo método descrito por Oyazu (1986). Quatro miligramas de cada extrato foram diluídos em 4 mL de água e adicionados 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 μ 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 RPM. 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.

O teste com o TBARS consiste na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos, sendo que um dos principais produtos formados é o malonaldeído (MDA), um aldeído com 3 átomos de carbono. Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de TBARS, formando um complexo de cor vermelha, que apresenta absorção em 532 - 535 nm. Em busca de aumentar a velocidade e a sensibilidade da reação são necessários meio ácido (pH 1-2) e temperatura elevada (100 °C) (SILVA et al., 1999).

Os ensaios foram padronizados de acordo com o método de Wong (KANIAS, WONG e ACKER, 2007), com algumas modificações. Foram preparadas 3 amostras com 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e 200 μ L de cada extrato dissolvido em metanol nas concentrações de 7,5; 15,0; e 30 mg. O controle positivo 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) foi utilizado nas mesmas concentrações dos extratos. O controle negativo possuía 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e 200 μ L de metanol. Todos esses preparados foram homogeneizados com auxílio de um mixer (seguindo a ordem controle negativo → controles positivos → extrato, sempre da menor para a maior concentração). Após homogeneização, as amostras foram levadas ao aquecimento, até o aparecimento de coloração marrom na carne. Após o cozimento da carne, adicionou-se água destilada até completar o volume de 100 mL e homogeneizou-se novamente com mixer. O conteúdo foi, então, transferido para frascos âmbar que foram armazenados em refrigerador.

No dia do preparo das amostras e nos 4 dias consecutivos, 0,5 g de cada homogenato foram colocados em tubos de ensaio. Logo após, adicionou-se 50 µL de solução etanólica de 2,6-di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) 4% (p/v), 2,5 mL de ácido fosfórico 1% (v/v) e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (p/v) (em NaOH 0,05 M). Estas soluções foram aquecidas em banho fervente por 15 minutos e em seguida resfriadas em banho de gelo por 10 minutos. Após resfriadas, adicionaram-se 3 mL de butanol em cada tubo de ensaio para que o complexo TBA-MDA (indicativo de oxidação da carne) passasse para a fase orgânica, após leve agitação por inversão. Os tubos foram, então, centrifugados a 4000 RPM por 5 minutos. 200 µL do sobrenadante (fase butanólica) de cada amostra foram retirados e levados para leitura em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração do complexo TBA-MDA foi calculada a partir da curva padrão de MDA. A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\text{Absorbância controle negativo} - \text{Absorbância extrato}}{\text{Absorbância controle negativo}} \times 100$$

4.4.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya* EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Preparo das soluções aquosas para administração oral

A concentração dos extratos administrados aos animais foi determinada previamente por teste oral de tolerância à glicose (ARAGÃO et al., 2010). Amostras de extratos e controles positivos foram inicialmente incorporados em lauril sulfato de sódio 0,6% e, posteriormente, diluídos em água. O controle negativo foi preparado com lauril sulfato de sódio 0,6% em água.

Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), protocolo número 093/2011, os quais estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, previstos pelo Colégio Brasileiro na Experimentação Animal (COBEA).

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 ± 2 °C, fotoperíodo de 12/12 horas e livre acesso à água e à ração comercial (Nuvital™, Colombo, PR, BR). Todos os procedimentos

Indução de diabetes melito

A indução do diabetes melito seguiu metodologia proposta por Patel e colaboradores (2006), com modificações. Uma injeção intravenosa de 40 mg/kg de estreptozotocina, em dose única, dissolvida em tampão citrato 0,1 M, pH 4,5. Os animais foram submetidos a um jejum prévio de 12 horas. Após 7 dias da administração da estreptozotocina, a glicemia de jejum foi determinada. Animais que apresentaram glicemia acima de 200 mg/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

Inicialmente, foram avaliados o extrato metanólico e partições hexânica, diclorometânica, em acetato de etila, butanólica e hidro-alcoólica das folhas de *Cecropia pachystachya*. A concentração do extrato metanólico (80 mg/kg) foi definida previamente por meio de estudos de dose efetiva com concentrações que variaram entre 40 a 400 mg/kg (dados não mostrados). Todas as partições foram também testadas na concentração de 80 mg/kg (dados não mostrados).

Diante dos expressivos resultados hipoglicemiantes apresentados pelo extrato metanólico e pela partição em acetato de etila, foram definidos dois extratos das folhas de *Cecropia pachystachya* para avaliação hipoglicemiante crônica, o extrato metanólico (EM) e o extrato em acetato de etila (EAE).

Os animais foram divididos em 8 grupos, de 6 animais cada, de acordo com a indução e o tipo de tratamento administrado:

Grupo diabéticos controle negativo (DCN) – animais diabéticos que receberam apenas o veículo (lauril sulfato de sódio 0,6% em água destilada)

Grupo diabéticos extrato metanólico (DEM) – animais diabéticos que receberam a solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* 80 mg/kg

Grupo diabéticos extrato em acetato de etila (DEA) – animais diabéticos que receberam a solução de extrato em acetato de etila de *C. pachystachya* 80 mg/kg

Grupo diabéticos glibenclamida (DG) - animais diabéticos que receberam solução de glibenclamida 3 mg/kg (controle positivo)

Grupo diabéticos metformina (DM) – animais diabéticos que receberam solução de metformina 120 mg/kg (controle positivo)

Grupo normais controle negativo (NCN) – animais não diabéticos que receberam apenas o veículo (lauril sulfato de sódio 0,6% em água destilada)

Grupo normais extrato metanólico (NEM) – animais não diabéticos que receberam a solução de extrato metanólico de *C. pachystachya* 80 mg/kg

Grupo normais extrato acetato de etila (NEA) – animais não diabéticos que receberam a solução de extrato em acetato de etila de *C. pachystachya* 80 mg/kg

Efeito hipoglicemiante crônico

Após confirmação da glicemia de jejum, os animais receberam, via oral, 1 mL de solução de EM, EAE, glibenclamida ou veículo, diariamente e de acordo com seus grupos. As administrações se deram sempre às 7 e 17 horas. Os animais não foram submetidos a um jejum prévio às administrações. Esse tratamento foi mantido por 6 meses. Mensalmente, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal para medida da glicemia de jejum. Além disso, foram monitorados a massa corporal e os consumos de ração e água ao longo de todo o tratamento.

Ao final de 6 meses, os animais foram eutanaziados por meio de aprofundamento anestésico seguido de punção cardíaca. Amostras de sangue foram coletadas para análises bioquímicas e hematológicas, além de serem coletados pâncreas, coração, fígado e rim para análises histológicas.

Para a dosagem de glicose-6-fosfatase seguiu-se a metodologia proposta por Koide e Oda (1959). Dois gramas de tecido hepático foram pesados e macerados com o auxílio de 10 mL de solução de sacarose 0,25 M gelada. Esse homogenato foi centrifugado a 110000 RPM, a 4°C, por 30 minutos e o sobrenadante foi removido e descartado. O pellet foi então ressuscitado em solução de sacarose 0,25 M + EDTA 1 mM. Após homogeneização completa em vórtex, o material foi armazenado a -80 °C até o momento da análise. A atividade do complexo enzimático glicose-6-fosfatase seguiu a metodologia descrita por Baginski e colaboradores (1974). Em uma placa de ELISA foram pipetados 200 µL de tampão cacodilato de sódio 0,1 M, 20 µL de homogenato, 10 µL de solução de sacarose 0,25 M e 10 µL de glicose-6-fosfato. A placa foi incubada a 37°C por 5 minutos e a reação foi interrompida com o acréscimo de 24 µL solução de ácido tricloroacético 2% + ácido ascórbico 10%. Em uma outra placa de ELISA, foram aliqüotados 10 µL da placa anterior e adicionou-se 150 µL de solução de ácido ascórbico e 50 µL de reagente molibdato (ambos do kit Doles para dosagem de fosfato inorgânico). Após 1 minuto em repouso aguardando a precipitação de proteínas, acrescentou-se 25 µL de solução alcalina, aguardou-se 2 minutos, em repouso, a temperatura ambiente, e as leituras foram

realizadas a 660 nm. Os cálculos foram expressos com base na concentração de fosfato inorgânico liberado (em nM) por mg de proteína.

As análises de glicogênio hepático e muscular seguiram a metodologia descrita por PIFFAR e colaboradores (2003) com modificações. Inicialmente, foi pesado aproximadamente 1 g do órgão e anotado o peso exato em uma tabela. Após pesagem, o material foi transferido para um tubo de ensaio de 20 mL e adicionara-se 5 mL de hidróxido de potássio (KOH) 1M. Os tubos foram então homogeneizados em vortex. Estes foram colocados em banho a 60 °C, por 30 minutos. Após esse tempo de incubação, os tubos foram retirados e novamente homogeneizados em vortex – 1 minuto para cada amostra, 2 vezes, no mínimo (até que se verificou a dissolução parcial do tecido em KOH). Uma alíquota de 2 mL de amostra de cada tubo foi retirada e transferida para um tubo de ensaio de 5 mL. Adicionaram-se aos poucos de 3 a 6 gotas de ácido acético glacial em cada tubo, observando a mudança da solução que se tornava turva, porém ainda líquida. A cada adição de ácido acético o pH foi medido com a fita indicadora de pH (o pH deve ser igual a 7.0). Após correção do pH, 100 µL de solução diluída de α -glicosidase (100 µg/mL) foram adicionados e homogeneizados em vortex – 1 minuto para cada amostra. Incubaram-se os tubos a 37 °C por 2 horas e após esse tempo, os tubos foram retirados do sonicador e homogeneizados, mais uma vez, em vortex. Os tubos foram então centrifugados por 5 minutos a 1500 RPM e o sobrenadante foi utilizado para dosagem de glicose através do kit Glicose PAP Liquiform. Estes valores foram convertidos em dosagens de glicogênio com o auxílio de fórmulas adequadas a esse cálculo.

As demais análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas utilizando-se kits comerciais (HEMOQUÍMICA® e LABTEST® e RHEABIOTECH, este último para análise de insulina somente).

Pâncreas, coração, fígado e rim 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 análise macroscópica, as amostras clivadas e selecionadas foram submetidas ao processamento histológico, ou seja, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (álcool 70%, 80%, 90%, 100% 1, 2, 3), diafanizadas em duas trocas de xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos confeccionados foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes de 4 micras de espessura utilizando-se micrótomo rotativo manual (American Optical 820™).

A seguir, as lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes de 4 micras de espessura obtidos dos blocos de parafina foram disparafinizados em dois banhos de xilol, de 15 minutos cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes (100%, 90% e 70%) por 3 minutos cada e hidratados em água corrente por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram contra corados pela Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos, sendo, em seguida, corados pela Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Para finalizar, os cortes foram montados utilizando-se Bálsamo do Canadá e lamínula (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 2013).

Os cortes foram analisados em toda a sua extensão por dois diferentes observadores que utilizaram o microscópio Olympus BX51® em aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x. A partir desta avaliação, foram selecionados campos para documentação fotográfica utilizando-se o software Image Pro Plus (Media Cybernetics™)

4.4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya* EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

No momento da eutanásia, parte do fígado coletado foi utilizado para análises antioxidantes. Além disso, foi também removido o cérebro do animal para tais análises. Os órgãos foram preparados e mantidos em um homogenato contendo tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. As amostras foram armazenadas em freezer – 80 °C até o momento da análise. Para avaliação do estresse oxidativo dos animais foram avaliadas enzimas antioxidantes, incluindo catalase (BEUTLER, 1975), superóxido dismutase (WINTERBOURN et al., 1975) e glutathiona reduzida (CARLBERG e MANNERVIK, 1985), além de ser dosado o produto da peroxidação lipídica, ácido tiobarbitúrico (KANIAS, WONG e ACKER, 2007).

Inicialmente foram preparados homogenatos dos órgãos coletados, fígado e cérebro, para as análises hipoglicemiantes e antioxidantes através de maceração inicial e extração em tampão fosfato de sódio, pH 7,4, 20 mM, contendo KCl 140 mM. Após extração, os homogenatos foram centrifugados a 10000 RPM, a 4 °C, por 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de enzimas antioxidantes (catalase, superóxido dismutase e glutathiona reduzida) e do metabolismo de carboidratos (glicose-6-fosfatase).

A dosagem de catalase (BEUTLER, 1975) foi realizada em uma microplaca de 96 poços, acrescentando-se 160 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 seguido de 20 µL de homogenato. A placa foi armazenada imediatamente em isopor com gelo para manter a temperatura baixa. No momento da análise, a placa foi incubada a 30 °C por 1 minuto no leitor de microplacas e no momento da análise acrescentaram-se 20 µL de H₂O₂ 0,3 M. Incubou-se a placa novamente por 10 segundos a 30 °C com agitação prévia de 5 segundos e as leituras foram realizadas a cada minuto por um tempo total de 5 minutos a 240 nm. Utilizou-se como branco: 180 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 mais 20µL de H₂O₂ 0,3 M.

Para a dosagem de superóxido dismutase (WINTERBOURN et al., 1975), em uma microplaca de 96 poços adicionaram-se 80 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 seguido de 20 μL de homegenato. A placa foi armazenada imediatamente em uma caixa de isopor com gelo e incubada a 30 °C por 1 minuto, no momento da análise. Após período de incubação, acrescentaram-se 40 μL de tampão fosfato 1 M, pH 7,0; 20 μL de solução estoque de xantina oxidase 0,07 UI/mL; 20 μL de solução estoque de hipoxantina 100 mM; 20 μL de solução estoque de NBT 15 mM. O branco foi preparado com 140 μL de tampão fosfato 1 M, pH 7,0; 20 μL de solução estoque de xantina oxidase 0,07 UI/mL; 20 μL de solução estoque de hipoxantina 100 mM; 20 μL de solução estoque de NBT 15 mM. A placa foi pré-incubada por 10 segundos com agitação prévia de 5 segundos e as leituras realizadas a cada minuto por um tempo total de 5 minutos a 560 nm.

A dosagem de glutathiona reduzida (CARLBERG e MANNERVIK, 1985) foi também realizada em uma microplaca, onde se adicionaram 80 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 seguidos de 20 μL de homegenato. A placa foi armazenada imediatamente em uma caixa de isopor com gelo e posteriormente incubada a 30 °C por 1 minuto, no momento da análise. Em seguida acrescentaram-se 50 μL de tampão fosfato 1 M, pH 7,0; 10 μL de solução de EDTA 0,2 mM; 20 μL de solução de glutathiona 10 mM; 20 μL de solução estoque de NADPH 0,1 mM. Para o preparo do branco acrescentaram-se na placa: 150 μL de tampão fosfato 1 M, pH 7,0; 10 μL de solução de EDTA 0,2 mM; 20 μL de solução de glutathiona 10 mM; 20 μL de solução estoque de NADPH 0,1 mM. Após pré-incubação da placa por 10 segundos com agitação de 5 segundos as leituras foram realizadas a cada minuto por um tempo total de 5 minutos a 340 nm.

4.5 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ORAL CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Cecropia pachystachya*

4.5.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Foram desenvolvidas formulações farmacêuticas orais contendo EAE e CMC como descrito abaixo.

Para se determinar as concentrações ideais de EAE e CMC contidas na formulação, a atividade hipoglicemiante agudadas formulações farmacêuticas foi avaliada em ratos Wistar. Para todos os ensaios, os animais foram induzidos ao diabetes utilizando estreptozocina de acordo com a metodologia descrita acima (ítem 4.4.2, página 85).

Inicialmente, foi determinada a concentração ideal do adjuvante carboximetilcelulose (CMC) que seria adicionada no preparo da formulação e, posteriormente determinou-se a concentração ideal de EAE a ser utilizado nessa formulação.

Para a determinação da dose ideal do adjuvante CMC foram testadas as concentrações de 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0% do adjuvante. Para todas as concentrações foram utilizados animais normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina, além de seus respectivos controles negativos. Isso somou um total de 16 grupos com 6 animais cada, divididos de acordo com a indução e o tratamento administrado:

Grupo Diabéticos Controle Negativo de CMC 0,2% (DCMC_DCN 0,2%) - ratos diabéticos tratados apenas com formulação base CMC 0,2%

Grupo Diabéticos Controle Negativo de CMC 0,5% (DCMC_DCN 0,5%) - ratos diabéticos tratados apenas formulação base CMC 0,5%

Grupo Diabéticos Controle Negativo de CMC 0,8% (DCMC_DCN 0,8%) - ratos diabéticos tratados apenas formulação base CMC 0,8%

Grupo Diabéticos Controle Negativo de CMC 1,0% (DCMC_DCN 1,0%) - ratos diabéticos tratados apenas formulação base CMC 1,0%

Grupo Diabéticos CMC 0,2% com EAE (DCMC_EAE 0,2%) - ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,2% e EAE 80 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 0,5% com EAE (DCMC_EAE 0,5%) - ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,5% e EAE 80 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 0,8% (DCMC_EAE 0,8%) - ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,8% e EAE 80 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 1,0% com EAE (DCMC_EAE 1,0%) - ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 1,0% e EAE 80 mg/kg

Grupo Normais Controle Negativo de CMC 0,2% (NCCMC_NCN 0,2%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 0,2%

Grupo Normais Controle Negativo de CMC 0,5% (NCCMC_NCN 0,5%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 0,5%

Grupo Normais Controle Negativo de CMC 0,8% (NCCMC_NCN 0,8%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 0,8%

Grupo Normais Controle Negativo de CMC 1,0% (NCCMC_NCN 1,0%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 1,0%

Grupo Normais CMC 0,2% com EAE (NCCMC_EAE 0,2%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 0,2% e EAE 80 mg/kg

Grupo Normais CMC 0,5% com EAE (NCCMC_EAE 0,5%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 0,5% e EAE 80 mg/kg

Grupo Normais CMC 0,8% com EAE (NCCMC_EAE 0,8%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 0,8% e EAE 80 mg/kg

Grupo Normais CMC 1,0% com EAE (NCCMC_EAE 1,0%) - ratos normais tratados com formulação base CMC 1,0% e EAE 80 mg/kg

Esses animais receberam por 14 dias consecutivos, doses diárias de seus respectivos tratamentos. Ao final do experimento, será realizado um teste oral de tolerância à glicose (TOTG).

No TOTG 1 mL dos respectivos tratamentos foi administrado nos animais após confirmação da glicemia de jejum (tempo 0). Trinta minutos depois, foi realizada uma nova medida de glicemia (tempo 0,5, não mostrado) e imediatamente administrado, via oral, 1 mL de solução de glicose 2 mg/kg. Amostras de sangue foram, então, coletadas da veia caudal 1; 2; 4; 6; 12 e 24 horas após administração dos tratamentos para medida da glicemia e construção da curva glicêmica.

Após ser determinada a concentração ideal de adjuvante, foi determinada a dose efetiva de EAE a ser utilizada durante o tratamento dos sintomas do diabetes. Para isso, utilizou-se ratos machos Wistar que foram divididos em 6 grupos de 6 animais cada, de acordo com o tratamento administrado:

Grupo Diabéticos Controle Negativo CMC 0,5% (DCMC_DCN) - ratos diabéticos tratados apenas com formulação base CMC 0,5%

Grupo Diabéticos CMC 0,5% com EAE 10 mg/kg (DCMC_EAE 10 mg/kg) – ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,5% EAE 10 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 0,5% com EAE 20 mg/kg (DCMC_EAE 20 mg/kg) – ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,5% EAE 20 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 0,5% com EAE 40 mg/kg (DCMC_EAE 40 mg/kg) – ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,5% EAE 40 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 0,5% com EAE 60 mg/kg (DCMC_EAE 60 mg/kg) – ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,5% EAE 60 mg/kg

Grupo Diabéticos CMC 0,5% com EAE 80 mg/kg (DCMC_EAE 80 mg/kg) – ratos diabéticos tratados com formulação base CMC 0,5% EAE 80 mg/kg

Após confirmação do quadro hiperglicêmico, esses animais foram tratados por 14 dias de acordo com os grupos descritos acima e, ao final desse período, submetidos a um TOTG para avaliação do efeito hipoglicemiante mais pronunciado.

4.5.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE CRÔNICA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Após definição das doses ideais de adjuvante e EAE procedeu-se ao tratamento crônico dos animais por 6 meses. Esses animais foram divididos em 7 grupos de 12 animais cada, de acordo com o tipo de indução e tratamento administrados:

Grupo diabéticos controle negativo (DCN) – animais diabéticos que receberam apenas veículo da formulação farmacêutica

Grupo diabéticos tratados (FFD) – animais diabéticos que receberam FF contendo EAE 20 mg/kg

Grupo diabéticos glibenclamida (DG) - animais diabéticos que receberam solução de glibenclamida na concentração de 3 mg/kg (controle positivo)

Grupo diabéticos metformina (DM) - animais diabéticos que receberam solução de metformina na concentração de 120 mg/kg (controle positivo)

Grupo diabéticos glimepirida (DGM) – animais diabéticos que receberam solução de glimepirida na concentração de 2 mg/kg (controle positivo)

Grupo normais controle negativo (NCN) – animais não diabéticos que receberam apenas veículo FF

Grupo normais tratados (FFN) – animais não diabéticos que receberam FF contendo EAE 20 mg/kg

Os animais receberam, via oral, 1 mL de solução de FF, glibenclamida, glimepirida ou veículo FF, diariamente. As administrações se deram sempre às 7 horas, com exceção do grupo DM, que recebeu duas doses diárias de metformina, às 7 e 17 horas. Os animais não foram submetidos a um jejum prévio às administrações. Esse tratamento foi mantido por 6 meses. Mensalmente, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal para medida da glicemia de jejum. Ao final dos 6 meses, 6 animais dos grupos DCN, FFD, NCN e FFN foram mantidos vivos, porém sem nenhum tipo de tratamento, para análises posteriores.

Durante todo o período do tratamento, foram monitorados a massa corporal, os consumos de água e ração, e o comportamento de cada animal. Quando eutanasiados, amostras de sangue desses animais foram coletadas por punção cardíaca para avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Tubos contendo as amostras foram armazenados 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, hemoglobina glicosilada e frutossamina foi realizada utilizando-se kits comerciais (HEMOQUÍMICA® e LABTEST®). Após coleta de sangue por punção cardíaca, os animais foram dissecados para retirada do fígado, coração, pâncreas e rim. Esses órgãos foram armazenados em solução de formol 10% para posterior análise histopatológica.

4.5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Cérebro, lavado de hemácias e porções do fígado foram reservados para análise antioxidante por meio da dosagem de catalase (BEUTLER, 1995), superóxido dismutase (WINTERBOURN et al., 1975) e glutathiona reduzida (CARLBERG e MANNERVIK, 1985) , além de ser dosado o produto da peroxidação lipídica, ácido tiobarbitúrico (KANIAS, WONG e ACKER, 2007).

4.5.4 EFEITO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA APÓS INTERRUPÇÃO DO TRATAMENTO EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Como mencionado anteriormente, após 6 meses de avaliação, 6 animais dos grupos DCN, FFD, NCN e FFN foram mantidos vivos, porém o tratamento foi interrompido. Esses animais foram mantidos por mais 6 meses, sendo acompanhados todos os parâmetros de evolução já dosados anteriormente durante o período em que recebiam tratamento. Além disso, foram monitorados os níveis de lactato, utilizado como parâmetro complementar de avaliação da estabilidade glicêmica e danos hepáticos.

4.6 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Cecropia pachystachya* EM RATOS DIABÉTICOS E NORMAIS

Para avaliação do pré-tratamento com FF foram utilizados ratos machos Wistar, com 60 dias de idade. Inicialmente, os animais foram divididos em 2 grupos de 12 animais cada, de acordo com o tratamento administrado:

Grupo Controle Negativo (CN) - animais que receberão apenas o veículo FF

Grupo tratado (FF) – animais que foram tratados com FF

Os animais foram tratados por um período de 14 dias. Após esse período, o diabetes melito foi induzido utilizando estreptozocina de acordo com metodologia já descrita (item 4.4.2, página 85).

Após confirmação do quadro diabetogênico, os animais foram redivididos em 4 grupos de 6 animais, de acordo com o tipo de indução e tratamento administrados:

Grupo Controle Negativo Induzidos (CNI) – animais que foram pré-tratados apenas com veículo FF e foram induzidos ao diabetes utilizando estreptozotocina. Esses animais continuaram a ser tratados com veículo FF após confirmação do quadro hiperglicêmico

Grupo FF Induzidos (FFI) – animais que foram pré-tratados com FF contendo EAE e foram induzidos ao diabetes utilizando estreptozotocina. Esses animais continuaram a ser tratados com FF contendo EAE após confirmação do quadro hiperglicêmico

Grupo Controle Negativo Não Induzidos (CNNI) – animais que foram pré-tratados apenas com veículo FF e não foram induzidos ao diabetes. Esses animais continuaram a ser tratados com veículo FF após confirmação do quadro hiperglicêmico

Grupo FF Não Induzidos (FFNI) – animais que foram pré-tratados com FF contendo EAE e não foram induzidos ao diabetes. Esses animais continuaram a ser tratados com FF contendo EAE após confirmação do quadro hiperglicêmico

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

Foi realizada segundo o “guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, publicado na resolução nº 90, de 16 de março de 2004, da ANVISA.

Para o teste de toxicidade aguda foram usados ratos Wistar machos e fêmeas. Os animais foram divididos em 10 grupos, com 6 animais cada, divididos de acordo com o tratamento administrado:

Grupo FF Controle Negativo (FFCN) - ratos machos normais tratados com FF apenas

Grupo FF 200 - ratos machos normais tratados com FF contendo EAE 200 mg/kg

Grupo FF 600 - ratos machos normais tratados com FF contendo EAE 600 mg/kg

Grupo FF 1000 - ratos machos normais tratados com FF contendo EAE 1000 mg/kg

Grupo FF 2000 - ratos machos normais tratados com FF contendo EAE 2000 mg/kg

Grupo FF Controle Negativo (FFCN) - ratos fêmeas normais tratados com FF apenas

Grupo FF 200 - ratos fêmeas normais tratados com FF contendo EAE 200 mg/kg

Grupo FF 600 - ratos fêmeas normais tratados com FF contendo EAE 600 mg/kg

Grupo FF 1000 - ratos fêmeas normais tratados com FF contendo EAE 1000 mg/kg

Grupo FF 2000 - ratos fêmeas normais tratados com FF contendo EAE 2000 mg/kg

Os animais receberam uma única dose e foram observados por 14 dias. Durante os 14 dias foram monitorados a massa corporal, os consumos de água e ração, e o comportamento de cada animal. Quando eutanasiados, amostras de sangue desses animais foram coletadas por punção cardíaca para avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos. Tubos contendo as amostras foram armazenados 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, hemoglobina glicosilada e frutossamina foi realizada utilizando-se kits comerciais (HEMOQUÍMICA® e LABTEST®). Após coleta de sangue por punção cardíaca, os animais foram dissecados para retirada do fígado, coração, pâncreas e rim. Esses órgãos foram armazenados em solução de formol 10% para posterior análise histopatológica.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos *in vitro* foi realizada pelo teste de ANOVA seguida de teste de Bonferroni. Para os testes *in vivo* foi utilizado o pós teste de Tuckey para análise de significância. As diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS MARCADORES MOLECULARES DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya*

Extratos padronizados são a base dos fitoterápicos (extratos vegetais contendo diversas substâncias) e fitofármacos (substâncias puras extraídas de vegetais). Porém, a partir da publicação da portaria da Anvisa RDC 48/04 de 16/03/04, o cenário de fitoterápicos e fitofármacos modificou substancialmente. A RDC 48/04 estabeleceu uma legislação específica, que se baseia na “garantia de qualidade (...) exigindo a reprodutibilidade dos fitoterápicos produzidos”, o que só pode ser alcançado se as empresas se utilizarem de extratos padronizados e estabelecerem rígido controle de qualidade. No entanto, como raramente se conhece o princípio ativo existente nas plantas medicinais brasileiras, a lei permite um controle via “marcadores moleculares”, que são substâncias presentes com regularidade em determinadas concentrações no extrato (BRASIL, 2010).

A análise quantitativa de marcadores dos extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), um método recomendado pela Anvisa no GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS (BRASIL, 2003). Como marcadores moleculares foram utilizados ácido clorogênico, isoorientina e orientina. A Figura 6 (página 105) ilustra os perfis cromatográficos por CLAE dos extratos metanólico e em acetato de etila.

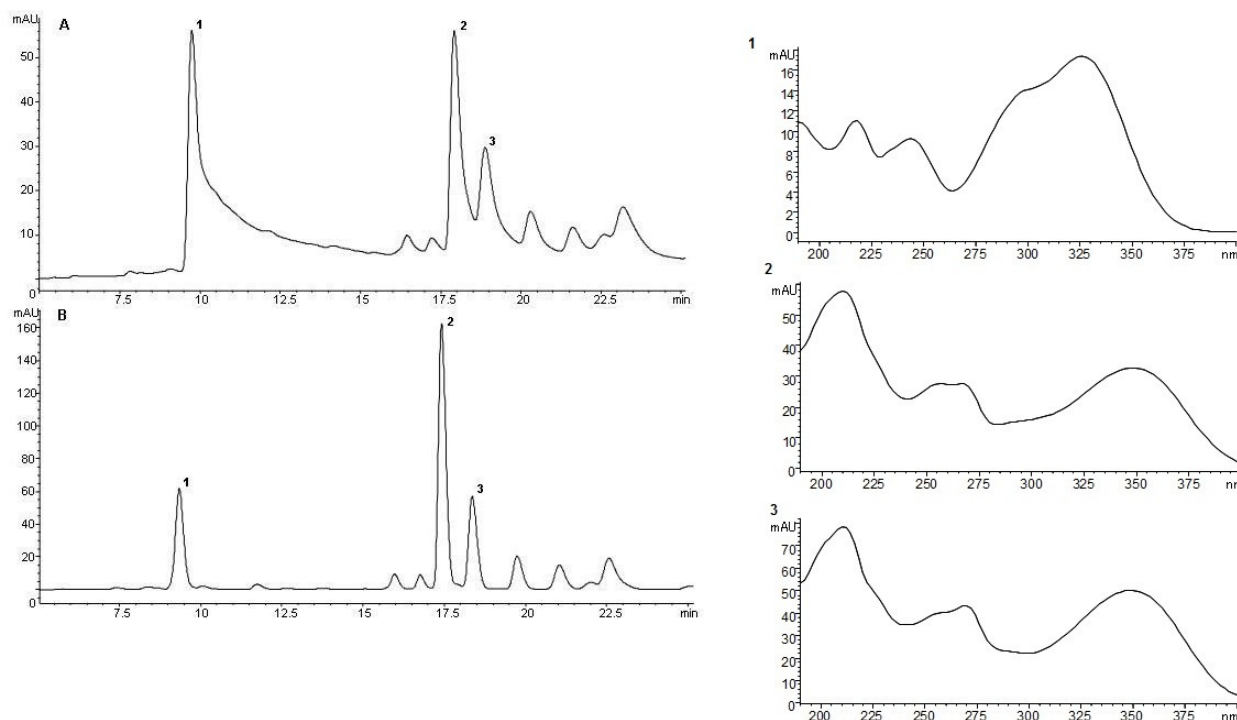


Figura 6: Perfil cromatográfico por CLAE dos extratos metanólico **(A)** e em acetato de etila **(B)** de *Cecropia pachystachya*. $\lambda = 280$ nm; **(1)** representa o espectro no ultravioleta do ácido clorogênico do pico **1** identificado como ácido clorogênico; **(2)** representa o espectro no ultravioleta da isoorientina do pico **2** identificado como isoorientina; **(3)** representa o espectro no ultravioleta da orientina do pico **3** identificado como orientina.

A análise do perfil cromatográfico por CLAE de ambos os extratos revelou a presença dos 3 marcadores moleculares, ácido clorogênico, isoorientina e orientina. Alguns estudos já destacam a presença de ácido clorogênico na espécie *Cecropia pachystachya* (ANDRADE-CETTO e WIEDENFELD, 2001; HERRERA-ARELLANO et al., 2004; REVILLA-MONSALVE et al., 2007; TANAE et al., 2007), além dos flavonoides isoorientina e orientina (ARAGÃO et al., 2010; LACAILLE-DUBOIS, FRANCK e WAGNER, 2001). Diante disso, esses 3 marcadores moleculares foram quantificados em EM e EAE e o método de quantificação foi validado por meio da análise de parâmetros de precisão, linearidade, limite de quantificação e detecção (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2 – Concentração e parâmetros da curva de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) do ácido clorogênico, isoorientina e orientina

Marcadores	Concentração EM ^a (mg/g)	Concentração EAE ^b (mg/g)	Equação da curva de calibração	Coefficiente de correlação (r)	Linearidade (µg/mL)	LOD ^c (µg/mL)	LOQ ^d (µg/mL)
Ácido clorogênico	12,40	11,40	$y = 36909x - 508,04$	0,9936	31,25 - 500	12,41	41,35
Isoorientina	7,30	54,10	$y = 28375x - 357,97$	0,9939	31,25 - 500	9,59	31,97
Orientina	55,70	83,10	$y = 7194,8x - 136,16$	0,9964	31,25 - 500	4,01	13,4

^aEM, extrato metanólico de *Cecropia pachystachya*; ^bEAE, extrato em acetato de *Cecropia pachystachya*; ^cLOD, limite de detecção; ^dLOQ, limite de quantificação

Tabela 3 – Precisão por repetibilidade do método para doseamento de ácido clorogênico, isoorientina e orientina

Marcadores	Concentração (µg/mL)	DRP* (%)
Ácido clorogênico	31,25	3,08
	125	1,84
	250	4,37
Isoorientina	31,25	2,81
	125	1,76
	250	1,05
Orientina	62,5	4,26
	125	0,12
	250	2,98

* DRP, desvio padrão relativo

Andrade-Cetto e Wiedenfeld (2001), Herrera-Arellano e colaboradores (2004), Revilla-Monsalve e colaboradores (2007) e Tanae e colaboradores (2007) descrevem o ácido clorogênico como o composto de maior concentração em espécies do gênero *Cecropia*. No entanto, conforme pode ser observado na Tabela 2 (página 106), orientina foi o composto que apresentou maior concentração tanto em EM quanto em EAE (55,70 e 83,10 mg/g, respectivamente). A divergência pode ser explicada, em parte, pela variação entre os solventes utilizados nas extrações, além da própria variação entre as espécies.

Andrade-Cetto e Wiedenfeld (2001) avaliaram os extratos aquoso e butanólico de *Cecropia obtusifolia*. Tanae e colaboradores (2007) também analisaram os extratos aquoso e butanólico, porém utilizaram a espécie *Cecropia glasiowii*. Revilla-Monsalve e colaboradores (2007) e Herrera-Arellano (2004) dosaram ácido clorogênico em infusão de folhas secas de *Cecropia obtusifolia*. Nesse estudo foram utilizados metanol e acetato de etila para a extração da espécie *Cecropia pachystachya*. Diversos trabalhos relatam potenciais atividades biológicas de extratos obtidos pela extração com etanol e metanol a partir de diferentes matérias-primas vegetais (SCHINITZLER et al., 2008; SHUKLA, SALUJA e PANDYA, 2009; KHADER et al., 2010; GUNADHARINI et al., 2011). O metanol, assim como o etanol, é um solvente polar efetivo na extração de flavonoides e seus glicosídeos, catecóis, taninos, carboidratos, compostos fenólicos, entre outros (YANG et al., 2009). O solvente orgânico acetato de etila apresenta uma provável extração de flavonoides, taninos, xantonas, triterpenos, saponinas e compostos fenólicos em geral (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998). Este fato foi corroborado em estudo realizado com sementes de uva, em que, entre os solventes empregados, o acetato de etila foi relatado com o maior rendimento na extração de polifenóis, com destaque para o desenvolvimento de extração seletiva de proantocianidinas (KOVAC e PEKÍC, 1991).

Além do tipo de solvente utilizado, o método de preparo dos extratos influencia tanto na classe de constituintes químicos a serem isolados quanto na concentração de cada um desses constituintes. Para o preparo de EM, a planta foi macerada por 72 horas em um único solvente, o metanol. Já no preparo de EAE, as folhas foram inicialmente maceradas em hexano por 24 horas e, posteriormente, em acetato de etila por 48 horas. O processo de maceração prévia em hexano no preparo de EAE foi imprescindível em sua semi purificação uma vez que no extrato hexânico ficaram retidos esteroides e terpenos, identificados por cromatografia em camada delgada. Dessa forma, ao macerar posteriormente em acetato de etila foi possível maximizar a extração de flavonoides, taninos e compostos fenólicos em geral. A Tabela 2 (página 106) mostra essa capacidade seletiva e maximizada na maceração em acetato de etila, destacando os maiores teores dos flavonoides isoorientina e orientina (54,10 e 83,10 mg/g, respectivamente) quando comparados a

EM (7,30 e 55,70 mg/g, respectivamente).

Vale ressaltar que o processo de identificação e quantificação de marcadores moleculares de um extrato requer o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos que por sua vez darão suporte às atividades biológicas testadas (CALIXTO, 2000). A validação de um método analítico tem por objetivo demonstrar que o mesmo é apropriado para a finalidade pretendida, garantindo por meio de estudos experimentais o atendimento a parâmetros de seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez adequados à análise (BRASIL, 2003). Nesse estudo, o método analítico foi validado por meio da análise dos parâmetros de precisão e linearidade, além dos limites de detecção e quantificação.

A precisão consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de amostragem múltipla de uma mesma amostra. Ela é considerada em 3 níveis, repetibilidade, precisão intermediária (realizada por analistas diferentes) e reprodutibilidade, essa última realizada em laboratórios diferentes (BRASIL, 2003). Neste trabalho, avaliou-se a repetibilidade (Tabela 3, página 106), considerada o parâmetro mais importante pela USP (United States Pharmacopoeae) (USP, 2000). Pode-se observar que o método tem boa repetibilidade, visto que o desvio padrão relativo (DRP) foi inferior ao especificado pela Anvisa que é de 5% (BRASIL, 2010).

A linearidade, por sua vez, consiste na capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (RABELO, PAULA e BARA, 2013). Nesse trabalho, utilizamos concentrações que variaram de 31,25 a 500 µg/mL (Tabela 2, página 106), sendo as absorbâncias correspondentes plotadas em um gráfico para cada composto analisado. Na análise de regressão linear encontramos a equação $y = 36909x - 508,04$, para ácido clorogênico; $y = 28375x - 357,97$, para isoorientina; $y = 7194,8x - 136,16$, para orientina. Conforme pode ser observado na Tabela 2 (página 106), todos os coeficientes de correlação se aproximam de 1,00, valor que comprova a linearidade do método, nas condições empregadas.

A validação do método analítico foi finalizada por meio da avaliação dos limites de quantificação e detecção. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser identificada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de detecção, por sua vez, consiste na menor quantidade do analito presente em uma amostra que possa ser determinado, porém não necessariamente quantificado (RABELO, PAULA e BARA, 2013). Os limites de detecção (12,41 para ácido clorogênico; 9,59 para isoorientina; 4,01 para orientina) e de quantificação (41,35 para ácido clorogênico; 31,97 para isoorientina; 13,4 para orientina) obtidos demonstram que o método é sensível.

Na literatura, há descrição desse mesmo método espectrofotométrico para quantificar os ácidos cafeico, clorogênico e gálico de *Cecropia glasiovii* (AREND, 2010). A cromatografia líquida de alta eficiência também foi o método utilizado por Junior (2013) para identificar orientina em extrato etanólico de *Cecropia pachystachya*. Cruz e colaboradores (2013) relataram a presença de apigenina, orientina, isoorientina, ácido clorogênico, catequina e epicatequina, isoquercetrina, luteolina e quercetina em extrato etanólico de *Cecropia pachystachya*. Entretanto, a validação analítica dessa espécie não foi demonstrada.

Por fim, destaca-se a grande importância da validação de métodos analíticos aplicados às plantas medicinais, seus extratos e até fitoterápicos visando contribuir para a homogeneização dos teores de princípios ativos presentes em determinada espécie. Isso por sua vez, influenciará nas atividades biológicas testadas, permitindo utilizar dosagens terapêuticas padronizadas.

5.2 ESTUDO FARMACOLÓGICO DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya*

5.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelos métodos de sequestro de radicais livres (método DPPH, GOVINDARAJAN et al., 2003), poder de redução (OYAZU, 1986) e análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (KANIAS, WONG e ACKER, 2007). Em todos os métodos, a atividade antioxidante apresentada pelo extrato em acetato de etila foi comparável às substâncias de referência rutina ou ácido ascórbico, de acordo com o método de avaliação utilizado.

No método do DPPH, os extratos metanólico e acetato de etila apresentaram, respectivamente, CI_{50} de $3,1 \pm 0,25$ e $1,93 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$. Foram utilizados como controle positivo rutina ($CI_{50} = 2,10 \pm 0,60$ $\mu\text{g/mL}$) e quercetina ($CI_{50} = 0,98 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$).

No método do poder de redução, os extratos metanólico e acetato de etila apresentaram, respectivamente, CE_{50} de $10,85 \pm 0,65$ e $0,71 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$. Foi utilizada como controle positivo ácido ascórbico ($CE_{50} = 1,80 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$).

As análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico dos extratos metanólico e acetato de etila foram expressas em teores de TBA e são apresentadas nos Gráficos 1 e 2 (páginas 111 e 112), respectivamente. Os resultados de ambos os extratos e do controle positivo BHT na concentração de 30 mg são também mostrados no Gráfico 3 (página 112).

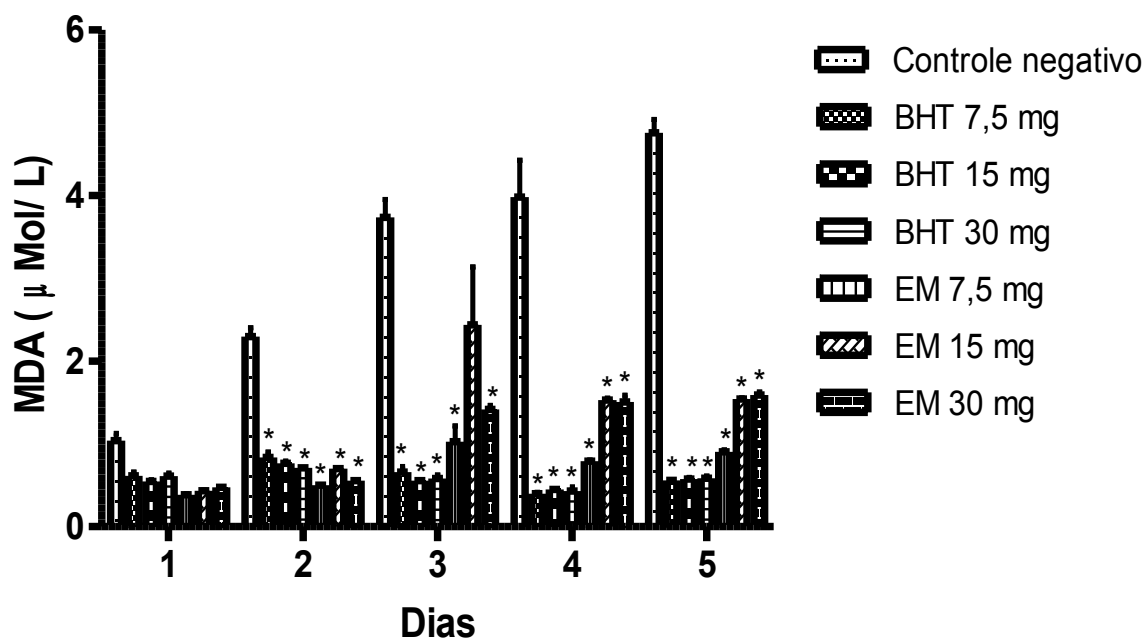


Gráfico 1: Efeito antioxidante do extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Água destilada é utilizada como controle negativo, e BHT como controle positivo. Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 3 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo controle negativo (ANOVA seguida de teste de Bonferroni)

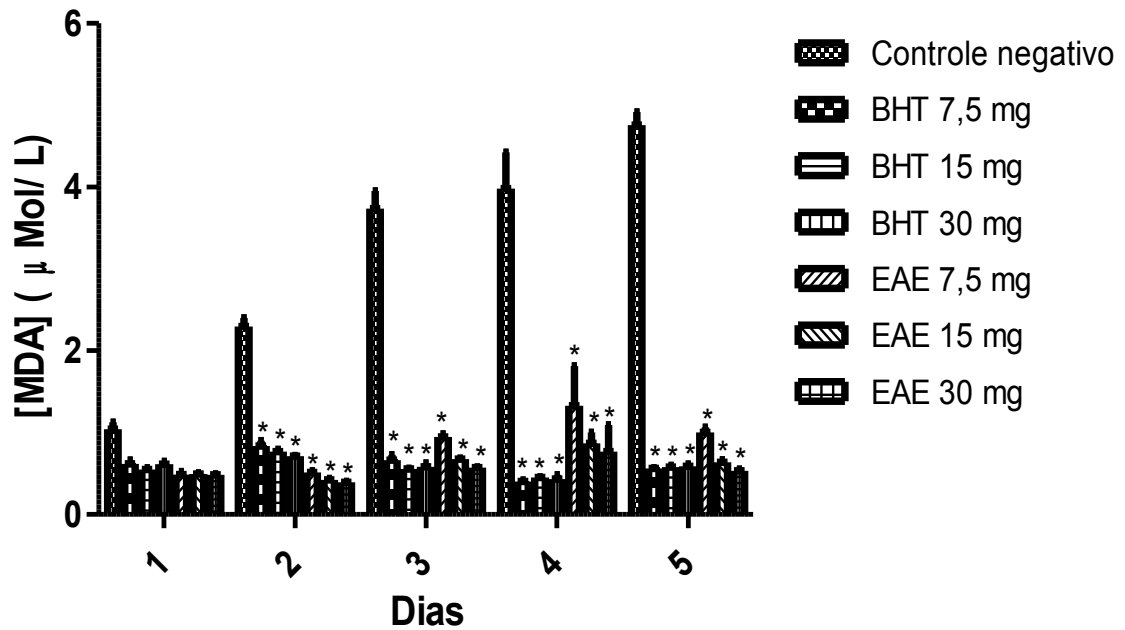


Gráfico 2: Efeito antioxidante do extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Água destilada é utilizada como controle negativo, e BHT como controle positivo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo controle negativo (ANOVA seguida de teste de Bonferroni)

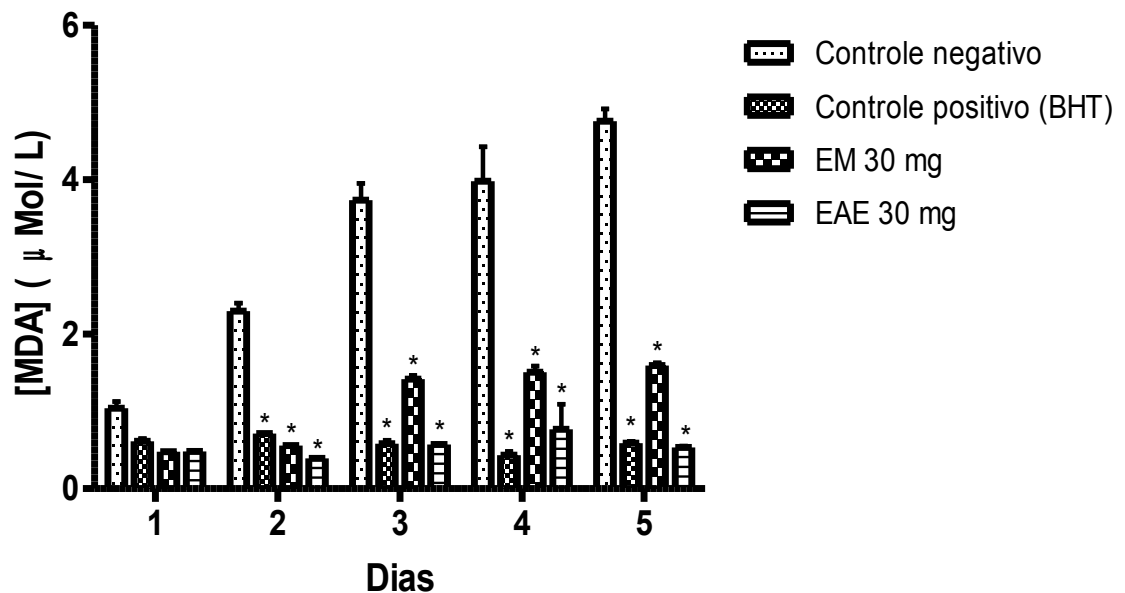


Gráfico 3: Efeito antioxidante dos extratos metanólico e acetato de etila de *Cecropia pachystachya*, na concentração de 30 mg, através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Água destilada é utilizada como controle negativo, e BHT 30 mg como controle positivo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo controle negativo (ANOVA seguida de teste de Bonferroni)

Na análise de TBARS, tanto EM quanto EAE demonstraram significativa atividade antioxidante (Gráficos 1 e 2, respectivamente), comparável ao controle positivo, BHT, com inibição da peroxidação lipídica durante todo o experimento. Também foi possível observar que com o aumento da concentração dos extratos, a atividade antioxidante apresentou-se maior. Sabe-se que a peroxidação lipídica é um processo oxidativo iniciado pela reação de um radical livre com o ácido graxo insaturado, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos (LIMA e ABDALLA, 2001).

Inúmeras alterações bioquímicas e fisiológicas estão associadas ao aumento de radicais livres e são resultantes do estresse oxidativo gerado por esse aumento. Van der Oost, Beyer e Vermeulen (2003) relataram que algumas das alterações bioquímicas podem ser configuradas como biomarcadores, destacando-se a peroxidação lipídica através do teste de TBARS. A quantificação de MDA reflete uma medida direta de um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados formados durante o processo oxidativo (RAHMAN, 2007). Essa peroxidação lipídica pode ser descrita como responsável pela perda das funções celulares sob condições de estresse oxidativo (HERMES-LIMA, 2004). Dessa forma, os níveis de TBARS, mesmo que dosados *in vitro*, podem ser usados para simular o estresse oxidativo.

O diabetes melito está associado a um aumento da produção de espécies de radicais livres e uma redução das defesas antioxidantes, caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Juntamente com outros fatores, o estresse oxidativo pode ser responsável pelo surgimento e agravamento de complicações do DM. O controle glicêmico é imprescindível para prevenir e regredir tais complicações. Adicionalmente, os antioxidantes surgem como adjuvantes no tratamento do paciente diabético. Diante disso, terapias antioxidantes como o uso de vitaminas, fitoterápicos, aminoácidos e drogas, têm sido testadas no combate ao estresse oxidativo no DM. (RAO, KESAVULU e APPARAO, 2001; ODETTI et al., 2003; MARITIM et al., 2003; AL-SHAMSI, AMIN e ADEGHATE, 2006; BARBOSA et al., 2006).

Sabe-se que a propriedade antioxidante de eliminar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, além de quelar metais reativos, reduzindo dessa forma o

estresse oxidativo, é atribuída a alguns compostos fenólicos de plantas (CHUN et al., 2005). Os resultados demonstraram um potencial antioxidante expressivo tanto para EM quanto para EAE, que pode ser atribuído, em parte, à presença de um ácido fenólico, o ácido clorogênico, e de dois flavonoides, isoorientina e orientina.

Neste contexto, tornou-se importante avaliar-se a ação de ambos os extratos em um modelo experimental de diabetes a fim de contribuir na terapia desta doença principalmente no auxílio da redução dos efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo, normalmente associado ao estado hiperglicêmico.

5.2.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE CRÔNICA DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya* EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Animais com diabetes induzido por substâncias químicas têm sido usados para estudar o diabetes tipo 1. A indução química do diabetes, em animais experimentais, ocorre após a destruição química seletiva das células B pancreáticas. As substâncias mais usadas para esta indução em ratos, camundongos e coelhos são o aloxano e a estreptozotocina. A dose destas drogas para indução do diabetes depende da espécie do animal e de sua massa corporal (SZKUDELSKI, 2001).

Para avaliação da atividade hipoglicemiante foi utilizado um modelo de indução com estreptozotocina. A indução de diabetes em ratos utilizando STZ pode ser conseguida utilizando doses múltiplas ou em uma dose única da droga (SIMIONESCU et al., 1996; EL-SWEFY et al., 2000). A STZ, na dosagem de 160 a 250 mg/kg, apresenta efeito citotóxico direto nas células B de camundongos. A STZ causa dano no ácido desoxirribonucleico (DNA), depletando a Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo inicia a morte das células B, através da depleção de energia. Em doses subdiabetogênicas (40 mg/kg), a STZ produz insulite pancreática, com morte progressiva das células B levando também ao diabetes melito (RAYAT et al., 2000). Nesse trabalho, foi utilizada uma única dose de 40 mg/kg, sendo observado após 7 dias da indução um aumento significativo da glicemia de jejum em todos os animais induzidos com estreptozotocina (Gráfico 4, página 117, e Tabela 4, página 118).

Inicialmente, para avaliação do efeito hipoglicemiante crônico, os animais foram submetidos a um tratamento de 6 meses com duas doses diárias de EM e EAE, além dos controles positivos glibenclamida e metformina.

Os gráficos de avaliação de evolução das glicemias, massa corporal, consumos de ração e água foram todos construídos sob a forma de área sob a curva. Nesse tipo de gráfico, as barras de cada grupo correspondem à área total entre a curva de evolução e o eixo x. Dessa forma, valores elevados de glicemia, massa corporal ou consumos de ração ou água aumentam a área entre a curva de evolução e o eixo x, elevando os valores das barras expressos nesse tipo de gráfico.

A análise do Gráfico 4(A) (página 117) mostra que valores elevados de glicemia ao longo dos 6 meses de tratamento caracterizaram áreas entre 3000 a 4000, como foi observado nos animais dos grupos DCN e DG. Os animais diabéticos tratados com metformina, EM e EAE, porém, apresentaram valores de áreas que não ultrapassaram 2000, reflexo de uma curva de evolução glicêmica mais estável ao longo dos 6 meses. As curvas de evolução glicêmica também foram expressas no Gráfico 4(B) (página 117).

A Tabela 4 (página 118) resume o efeito hipoglicemiante dos tratamentos, mostrando os valores inicial e final das glicemias de jejum de cada grupo. Além disso, a Tabela 4 traz a porcentagem de redução da glicemia, calculada com base na diferença entre as glicemias final e no momento de confirmação do quadro hiperglicêmico (glicemia inicial).

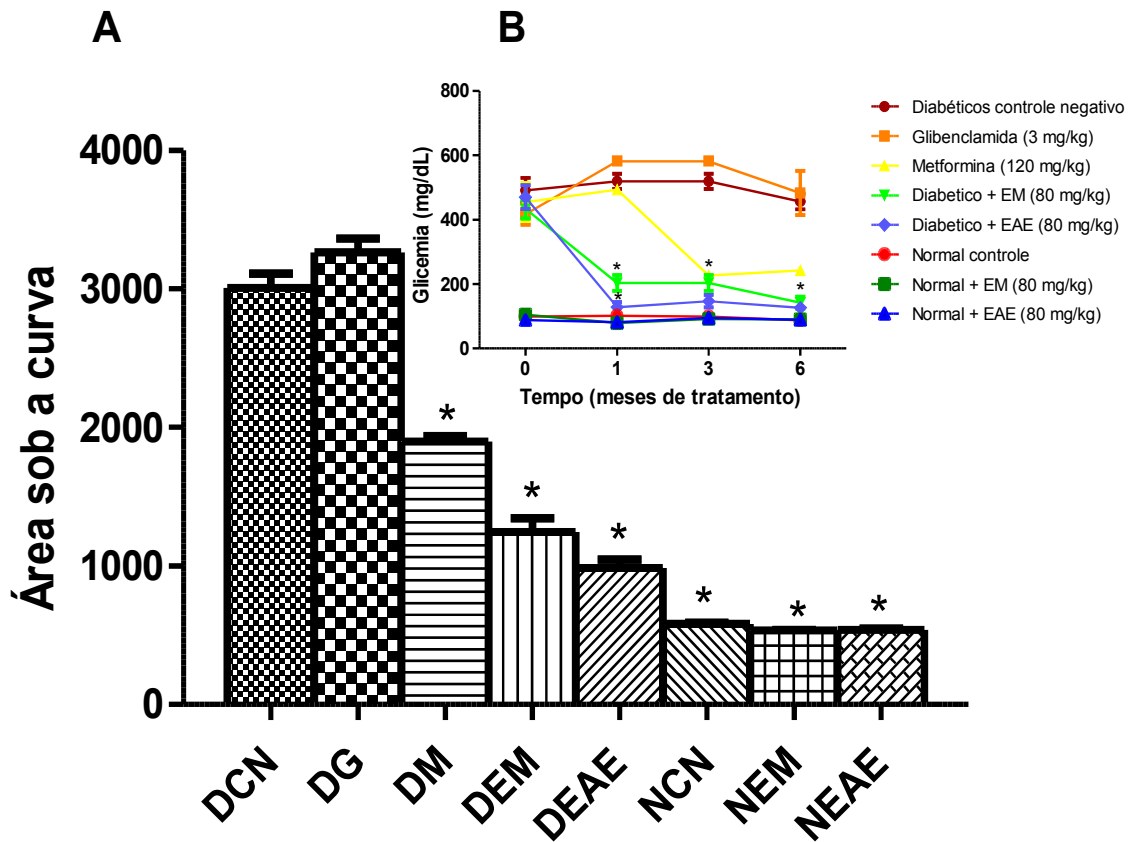


Gráfico 4: **A** Área sob a curva dos níveis de glicemia em ratos diabéticos e normais após a indução com estreptozotocina 40 mg/kg i.v. (tempo 0) e após 1, 3 e 6 meses de tratamento (tempos 1, 3 e 6) com em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais tratados com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos. **B** Níveis glicêmicos em ratos diabéticos e normais após a indução com estreptozotocina 40 mg/kg i.v. (tempo 0) e após 1, 3 e 6 meses de tratamento (tempos 1, 3 e 6) com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos. DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg), NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo DCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Tabela 4: Redução da glicemia de jejum dos animais diabéticos tratados com extratos metanólico (EM) e acetato de etila (EAE) de *Cecropia pachystachya*, glibenclamida e metformina.

Grupos de tratamento	Glicemia inicial (mg/dL)^a	Glicemia ao final do tratamento (mg/dL)^b	Redução da glicemia (%)^c
EM	433,50 ± 29,03	142,33 ± 18,68	67*
EAE	470,67 ± 36,93	126,33 ± 10,03	73*
Glibenclamida	417,17 ± 32,70	483,50 ± 68,66	-
Metformina	455,00 ± 59,60	242,00 ± 8,86	47*

^a Glicemia inicial refere-se ao valor medido antes de iniciar o tratamento. ^b Glicemia ao final do tratamento refere-se ao valor medido após 6 meses de tratamento com os extratos metanólico e em acetato de etila, glibenclamida e metformina. ^c Redução da glicemia refere-se à porcentagem de redução, calculada com base na diferença entre as glicemias final e inicial. * Redução significativa da glicemia ($p < 0,05$)

Como pode ser observado na Tabela 4 (página 118), EM, EAE e metformina reduziram de maneira significativa as glicemias de jejum (67, 73 e 47%, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com glibenclamida não reduziu a glicemia de jejum ao longo de 6 meses, mantendo valores elevados de glicemias de jejum ao longo de todo o tempo de avaliação.

A possível redução da área ocupada pelas ilhotas pancreáticas dos animais do grupo DCN confirma o quadro diabetogênico, sugerindo que a dose de STZ administrada na indução foi capaz de provocar diabetes tipo 1 nos animais. Além da provável retração das ilhotas, é possível observar focos de células adiposas no parênquima pancreático nos animais desse grupo DCN (Figura 7, página 119).

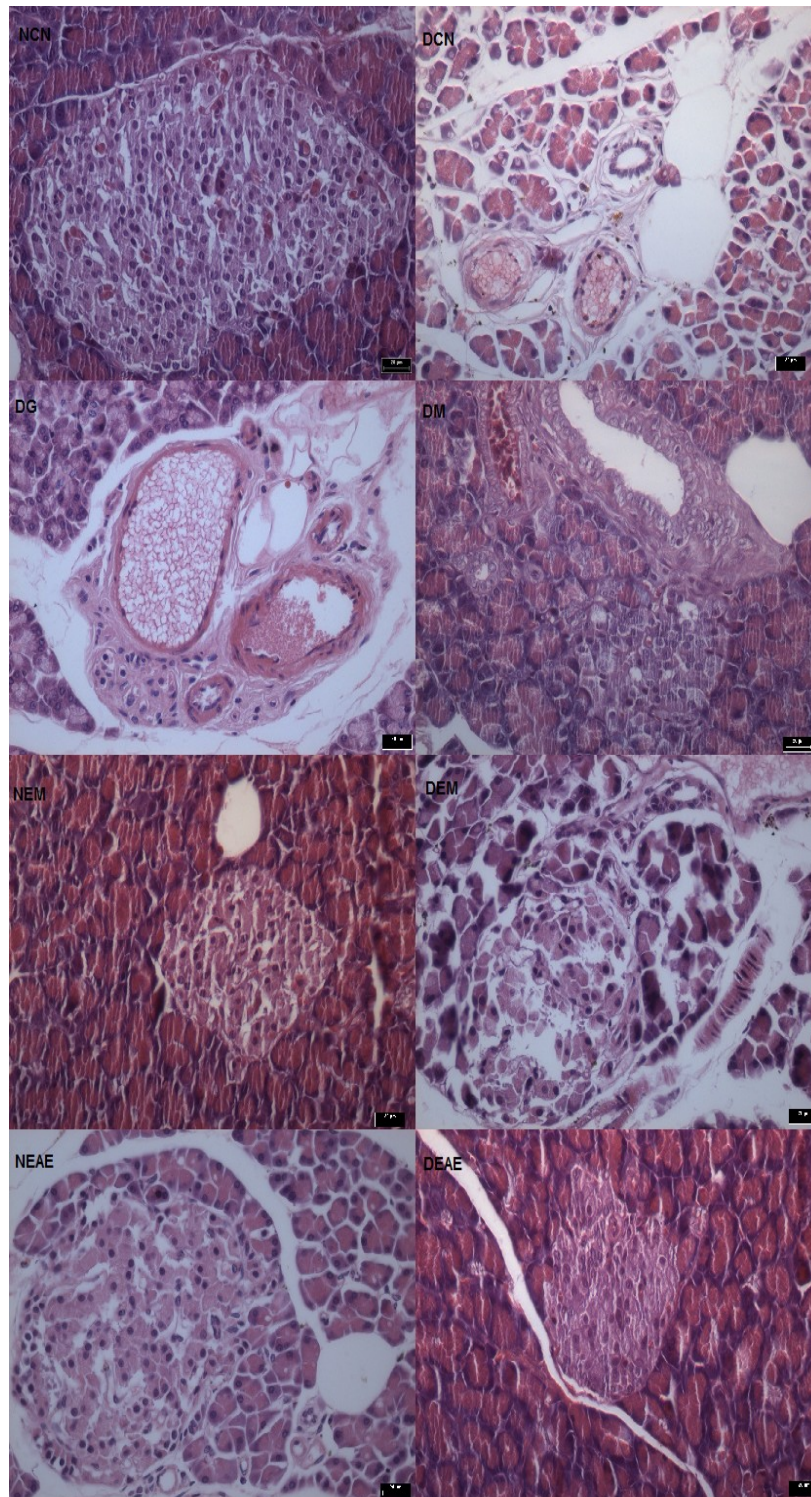


Figura 7: Fotomicrografias histológicas de cortes pancreáticos (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg).

Após 3 meses de tratamento, os animais que receberam EM apresentaram uma redução de 53% da glicemia de jejum em relação à sua glicemia inicial, quando ainda não havia tratamento. Ao final do tratamento, após 6 meses, essa redução chegou a 67% (Gráfico 4, página 117, e Tabela 4, página 118). No entanto, como podemos verificar na Figura 7 (página 119), nem todas as alterações pancreáticas foram revertidas, uma vez que ainda é possível observar nesse grupo a presença de células adiposas.

Hori e colaboradores (2014) afirmaram que há uma correlação direta entre a metaplasia adiposa do parênquima pancreático e doenças crônicas como obesidade e DM. Análises histopatológicas de pacientes com pancreatite aguda ou carcinoma pancreático revelaram a prevalência desse infiltrado adiposo. Grande parte desses pacientes eram diabéticos ou obesos com histórico familiar de diabetes. Os autores relacionaram a metaplasia adiposa ao aumento do estresse oxidativo, característico desses pacientes. Além disso, observou-se um aumento no nível sérico de adipocitocinas que induziriam a uma lipotoxicidade pancreática e consequente resposta inflamatória local, especialmente nas células acinares ao redor das ilhotas.

Já os animais que receberam EAE apresentaram, após 3 meses de tratamento, 69% de redução da glicemia de jejum em relação à sua glicemia inicial, quando ainda não havia tratamento. Essa redução, ao final de 6 meses, chegou a 73% (Gráfico 4, página 117, e Tabela 4, página 118). Além disso, observamos na Figura 7 (página 119) uma significativa preservação do parênquima pancreático, tanto em relação às próprias ilhotas quanto à ausência de células adiposas, contrastando com o que foi observado no grupo DEM.

A redução da glicemia nos animais tratados com EM foi significativa quando comparados os grupos de animais diabéticos tratados com esse extrato e aqueles que não receberam nenhum tipo de tratamento (DCN) (Gráfico 4, página 117). No entanto, como anteriormente mencionado, a resposta do grupo EM no início do tratamento não mostrou-se tão efetiva quanto no grupo EAE. Após 3 meses do tratamento com doses diárias de EM, os animais diabéticos apresentaram uma redução significativa da glicemia de jejum. Porém, os animais diabéticos tratados com EM ainda não tinham atingindo níveis normais (<99 mg/dL). Esses níveis não foram completamente atingidos mesmo após 6 meses de tratamento. Já os animais

tratados com EAE, tiveram suas glicemias reduzidas aos níveis normais já nos primeiros meses de tratamento. Esse comportamento foi observado também ao longo dos últimos 3 meses, refletindo o controle glicêmico dos animais desse grupo ao longo de 6 meses. Esses resultados evidenciaram uma considerável capacidade hipoglicemiante de EAE que pode ser atribuída, em parte, à presença de ácido clorogênico, isoorientina e orientina e à elevada concentração desses dois flavonoides em EAE quando comparados aos níveis em EM.

A homeostase glicêmica é mantida por um equilíbrio entre a utilização de glicose por todos os órgãos, controlada de maneira hormonal, a produção de glicose hepática e a absorção intestinal desse açúcar. Como a maioria dos órgãos não possui a capacidade de produção de quantidade suficiente de glicose para dar suporte às suas funções metabólicas, eles necessitam de um aporte contínuo através da glicose sanguínea. O fígado e os rins são responsáveis por manter esta oferta por meio da produção de glicose a partir de precursores gliconeogênicos e do próprio glicogênio e, posteriormente, por liberar esse açúcar no sangue. Dentro destes órgãos (fígado e rins), uma enzima se destaca, glicose-6-fosfatase (G6Pase). Ela desempenha um papel central na homeostase da glicemia por hidrolisar glicose-6-fosfato (G6P, o produto da gliconeogênese e da glicogenólise) em glicose, que é subsequentemente liberada para a corrente sanguínea (BASSOLI et al., 2008).

Nesse trabalho, o controle glicêmico observado nos animais tratados com EM e EAE pode ser atribuído, em parte, à presença de ácido clorogênico, um inibidor competitivo reversível da translocase da glicose-6-fosfato. O ácido clorogênico é um sensibilizador de insulina que facilita a ação desse hormônio de maneira semelhante à ação terapêutica da metformina (SOTILLO e HADLEY, 2002). Estudos demonstraram que o ácido clorogênico promove uma redução significativa no pico glicêmico em teste oral de tolerância à glicose por meio da redução da absorção intestinal de glicose, além do estímulo à secreção de insulina (ONG et al., 2012). Além disso, Ong e colaboradores (2012) investigaram o papel de ácido clorogênico na regulação do transporte de glicose no músculo esquelético isolado a partir de camundongos *db/db*. Os resultados demonstraram que ácido clorogênico estimula o transporte de glicose no músculo esquelético por meio da ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Essa ativação da AMPK leva à translocação de

GLUT 4 a partir membranas intracelulares, aumentando, assim, a captação periférica de glicose.

No diabetes melito as células do parênquima hepático, apesar de não requererem insulina para captação de glicose, tem capacidade reduzida na remoção de glicose do sangue. O conteúdo de glicogênio hepático foi marcadamente reduzido em ratos diabéticos, devido ao insuficiente nível de insulina (STALMANS et al., 1997). Isso pode ser explicado, em parte, pela atividade diminuída de glicoquinase e perda de ação da insulina sobre enzimas-chave da glicogênese (glico e hexoquinase, glicogênio sintase) e via glicolítica (hexoquinase, 6-fosfofruto-1-quinase, piruvato quinase).

A ausência ou deficiência de insulina estimula ainda gliconeogênese constante, tendo como consequência hiperglicemia e cetoacidose resultante de lipólise aumentada no tecido adiposo e de oxidação de ácidos graxos acelerada no fígado. DM tipo 1 é então caracterizado por hiperglicemia, hipertriacilglicerolemia e episódios de severa cetoacidose. No músculo e tecido adiposo, GLUT 4 permanece sequestrado no meio intracelular. A gliconeogênese acelerada associada à proteólise descontrolada no músculo esquelético, mantém a hiperglicemia de maneira constante.

A Tabela 5 (página 124) mostra que, após 6 meses de tratamento, houve uma redução significativa nos níveis de glicogênio hepático e muscular nos animais diabéticos, quando comparados com o grupo NCN ($p < 0,05$). O tratamento dos animais diabéticos com EM e EAE aumentou significativamente o nível de glicogênio hepático e muscular quando comparados com animais do grupo DCN ($p < 0,05$). Isto pode ser atribuído, em parte, à presença de ácido clorogênico, devido à ativação da via de AMPK, como mencionado anteriormente. Além disso, podemos atribuir estes níveis de glicogênio hepático e muscular elevados nos animais diabéticos tratados com EM e EAE a um aumento da secreção pancreática de insulina a partir de células das ilhotas regeneradas, ou através da preservação da massa dessas células ao longo do tratamento (Figura 7, página 119), conforme evidenciado também pelo aumento significativo no nível de insulina em DEM e DEAE (Tabela 5, página 124).

O efeito direto de EAE sobre a regeneração ou a preservação das ilhotas pancreáticas foi confirmado pelos estudos histológicos (Figura 7, página 119). A análise histopatológica do pâncreas dos grupos DEM e DEAE se assemelham ao aspecto apresentado pelos animais normais (NCN, NEM e NEAE), exceto pela presença de células adiposas no grupo DEM, conforme mencionado anteriormente.

A avaliação de hemoglobina glicada e frutossamina confirma a instabilidade glicêmica dos grupos diabéticos não tratados, como daqueles tratados com glibenclamida. Esse grupo apresentou valores alterados de ambos os parâmetros, o que não foi observado para aqueles animais que foram tratados com EAE (Tabela 5, página 124).

Tabela 5: Níveis de insulina, frutossamina, glicose-6-fosfatase e glicogênios hepático e muscular de animais diabéticos e normais tratados com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	Insulina ($\mu\text{g/mL}$)	HbA1c (% total Hb) ^a	Frutossamina (mM/L)	Glicose-6- fosfatase (nM Pi/mg proteína)	Glicogênio hepático ($\mu\text{M/L}$)	Glicogênio muscular ($\mu\text{M/L}$)
NCN^g	10,51 \pm 0,50	0,82 \pm 0,12	0,82 \pm 0,12	14,49 \pm 1,24	150,32 \pm 41,42	143,99 \pm 1,46
DCN^b	4,54 \pm 0,06*	19,16 \pm 2,03*	3,96 \pm 0,63*	14,26 \pm 0,47	45,90 \pm 7,11*	40,63 \pm 5,37*
DG^c	6,07 \pm 1,36*	12,09 \pm 0,23	3,09 \pm 0,23	9,92 \pm 0,38*	45,72 \pm 7,21*	50,09 \pm 6,17*
DM^d	4,73 \pm 0,16*	1,01 \pm 0,09	1,01 \pm 0,09	16,95 \pm 1,30	41,74 \pm 5,85*	40,56 \pm 9,00*
DEM^e	7,79 \pm 0,40	0,98 \pm 0,39	0,98 \pm 0,39	1,87 \pm 0,34*	194,55 \pm 8,66*	139,53 \pm 3,93
DEAE^f	9,88 \pm 0,11	1,06 \pm 0,04	1,04 \pm 0,04	2,72 \pm 0,52*	201,78 \pm 17,52*	192,02 \pm 40,76*
NEM^h	9,78 \pm 0,62	0,77 \pm 0,08	0,77 \pm 0,08	2,24 \pm 0,31*	149,57 \pm 20,79	144,56 \pm 25,88
NEAEⁱ	9,83 \pm 0,43	1,07 \pm 0,11	1,07 \pm 0,11	3,44 \pm 0,34*	223,77 \pm 10,73*	135,26 \pm 11,49

^a HbA1c, Hemoglobina glicada. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^f DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ⁱ NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Além desses parâmetros, o tratamento com EM, EAE e controles negativos e positivos foi monitorado em relação à evolução de massa corporal, consumos de ração e água (Gráfico 5, página 126). Como explicado anteriormente, as evoluções foram avaliadas em gráficos de área sob a curva, em que as barras expressam a área total entre a curva de evolução e o eixo x. Na evolução da massa corporal, valores elevados ao longo dos 6 meses de avaliação apresentaram áreas entre 1500 a 2000, conforme observado nos animais dos grupos DEAE, NCN, NEM e NEAE. No consumo de ração as maiores áreas foram encontradas para o grupo DCN, em torno de 300. O mesmo grupo apresentou os valores mais elevados de área no consumo de água também, em torno de 1000.

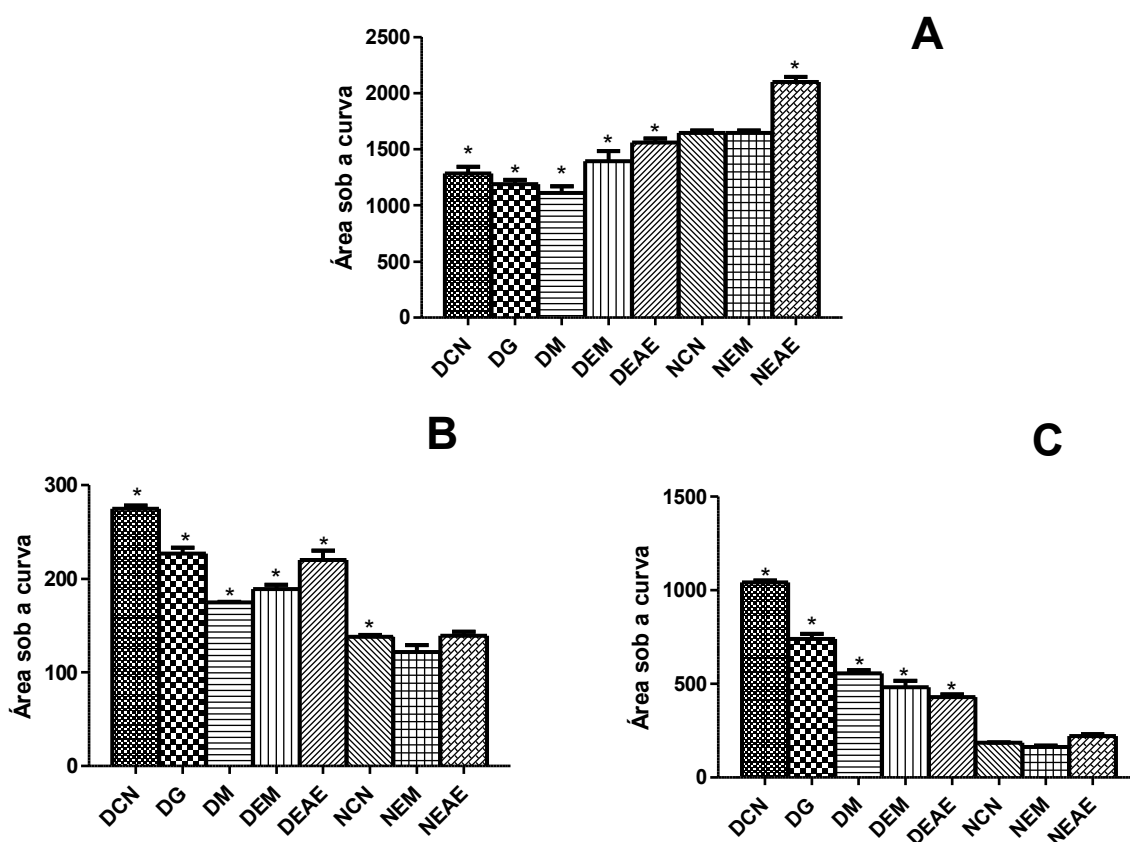


Gráfico 5: Área sob a curva de evolução da massa corporal (A), consumo de ração (B) e consumo de água (C) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais tratados com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos. DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg), NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa alteração significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

O consumo de ração e água são parâmetros importantes a serem monitorados durante uma avaliação de efeito hipoglicemiante, uma vez que a polifagia é uma das 3 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). Além disso, 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). O tratamento com EM e EAE reduziu significativamente ($p < 0,05$) os consumos de água e ração (Gráfico 5, página 126), consequências diretas do controle glicêmico desses animais ao longo dos 6 meses de tratamento.

Além das alterações características do diabetes já citadas acima, polidipsia e polifagia, outro sintoma recorrente em alguns pacientes diabéticos, especialmente os do tipo 1, é a perda de massa corporal de maneira rápida e progressiva. Uma redução significativa ($p < 0,05$) foi observada nos animais DCN. A redução de massa corporal em animais induzidos por STZ é causada por uma degradação de proteínas estruturais, consequência da alteração no metabolismo de carboidratos observada nesses animais (CHEN e IANUZZO, 1982). Por outro lado, os animais que foram tratados com EM e EAE não apresentaram redução significativa da massa corporal ao longo dos 6 meses de tratamento (Gráfico 5, página 126).

Análises de parâmetros bioquímicos e hematológicos não revelaram nenhuma alteração significativa naqueles animais tratados com EAE, diferente do observado para os não tratados e aqueles tratados com glibenclamida e metformina. Estes últimos apresentaram alterações em parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e/ ou renal, além de aumentos significativos nos seus perfis lipídicos (triglicérides, colesterol total e colesterol LDL) (Tabelas 6, 7, 8 e 9).

Tabela 6: Perfil lipídico de ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	CT ^a	LDL ^a	VLDL ^a	HDL ^a	TG ^a
NCN^g	100,53 ± 13,64	46,13 ± 13,88	16,25 ± 2,66	38,15 ± 7,01	81,27 ± 13,29
DCN^b	154,22 ± 6,64*	104,40 ± 6,73*	28,44 ± 1,05*	21,38 ± 1,92*	142,22 ± 5,27*
DG^c	168,03 ± 9,14*	126,38 ± 9,85*	22,42 ± 2,48	19,23 ± 2,09*	112,11 ± 12,41
DM^d	142,96 ± 16,49*	75,29 ± 8,35*	15,67 ± 2,21	50,71 ± 8,83*	78,35 ± 11,06
DEM^e	118,73 ± 11,30	68,95 ± 10,43	18,29 ± 2,89	31,50 ± 5,91	91,43 ± 14,42
DEAE^f	108,56 ± 5,35	38,79 ± 0,90	23,22 ± 2,74	46,55 ± 1,75*	116,12 ± 13,72
NEM^h	122,14 ± 8,31	66,17 ± 11,40	15,01 ± 1,84	40,97 ± 3,74	75,04 ± 9,20
NEAEⁱ	134,64 ± 14,88	53,58 ± 2,33	16,48 ± 1,82	64,58 ± 12,30*	82,40 ± 9,11

^a CT, colesterol total; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos. Todos os parâmetros estão expressos em mg/dL. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclâmida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^f DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg), ⁱ NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

A hipercolesterolemia observada em animais induzidos com STZ resulta da absorção intestinal e da síntese elevadas de colesterol (EBARA et al., 1994). As lipoproteínas de ratos diabéticos são oxidadas e demonstram citotoxicidade, um aspecto que pode ser prevenido pela insulina ou tratamento antioxidante. Estudos demonstraram que o metabolismo de lipídios de animais é influenciado pelo diabetes, aumentando a concentração de triglicerídeos e colesterol (EBARA et al., 1994; MATHE, 1995), corroborando com dados deste trabalho.

Dentre as complicações relacionadas ao diabetes melito, destacam-se as dislipidemias, caracterizadas por um aumento considerável nos níveis de colesterol total e das lipoproteínas LDL e VLDL, além de uma redução significativa do HDL e um aumento nos triglicerídeos. Um aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol pode levar ao desenvolvimento de aterosclerose. Adicionalmente, os níveis elevados de triglicerídeos são também considerados importantes fatores de risco para o acúmulo de placas ateroscleróticas e todas as complicações consequentes desse acúmulo (JONES e CHAMBLISS, 2000; HOPKINS et al., 2005). Por outro lado, a lipoproteína de alta densidade, o HDL, carrega colesterol e ésteres de colesterol dos tecidos para o fígado, executando o transporte reverso dessas substâncias para serem metabolizadas como ácidos biliares (STEIN e STEIN, 1999). Esta constitui uma importante via de redução nos níveis de colesterol sanguíneo e nos tecidos, inibindo, dessa forma, a formação de placas ateroscleróticas. Como podemos observar na Tabela 6 (página 128) os animais diabéticos controle negativo e aqueles que receberam glibenclamida ou metformina apresentaram, em geral, uma elevação dos parâmetros do perfil lipídico. Já EM e EAE foram capazes de manter níveis próximos aos parâmetros normais, destacando o valor de HDL para os animais diabéticos que foram tratados com EAE que foi significativamente maior que os valores normais. Níveis elevados de HDL estão relacionados ao um efeito cardioprotetor, importante no retardo de desenvolvimento de complicações diabéticas. Os resultados desse trabalho (Tabela 6, página 128) sugerem que EM e EAE são efetivos agentes hipocolesterolêmicos, além de atuarem na proteção contra complicações cardiovasculares resultantes do DM.

Karthikesan, Pari e Menon (2010) avaliaram o efeito do ácido clorogênico sob as alterações do perfil lipídico, além de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios em ratos diabéticos induzidos por STZ. Os autores demonstraram um aumento significativo das concentrações plasmática, hepática e renal de lipídios, colesterol, triglicerídeos, ácidos graxos e fosfolipídios em animais induzidos por estreptozotocina. Além disso, eles observaram um aumento nos níveis de LDL e VLDL, acompanhados de uma redução significativa de HDL nesses animais. Ao serem tratados com ácido clorogênico, os animais demonstraram redução significativa dos níveis de colesterol total, LDL e VLDL, além de uma redução dos

triglicerídeos. No entanto, não houve um aumento significativo na concentração de HDL, como observado nesse estudo. Dessa forma, os resultados observados para o tratamento com EAE podem ser atribuídos apenas em parte à presença do ácido clorogênico.

A análise histopatológica do tecido muscular cardíaco confirma as alterações decorrentes da alteração no perfil lipídico observada nos animais DCN. Nesses animais foi possível identificar alterações vasculares, ectasia e congestão vascular, além de um aumento na espessura das fibras miocárdicas, possivelmente decorrentes do acúmulo de colesterol e triglicerídeos ao longo do período de avaliação (Figura 8, página 131).

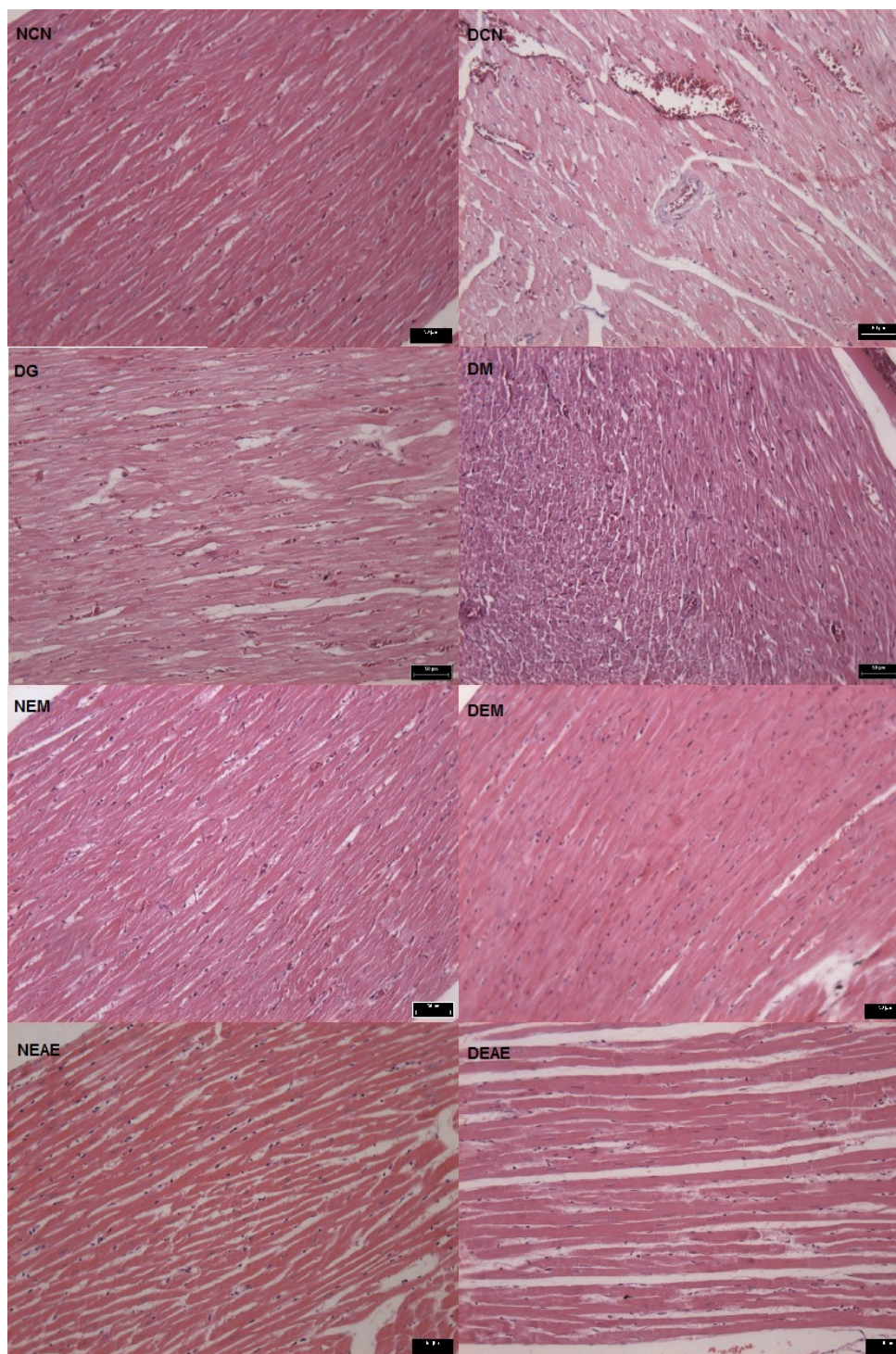


Figura 8: Fotomicrografias histológicas do tecido muscular cardíaco (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg).

Bell, Hye e Miyai (1984) demonstraram que animais que receberam a mesma concentração de STZ que os animais do presente trabalho apresentaram tumores hepáticos. Dessa forma, foi avaliado um possível dano hepático por meio de marcadores séricos, sendo observadas alterações significativas em todo o perfil de enzimas dos animais DCN (Tabelas 7 e 8, páginas 132 e 135, respectivamente). Além disso, foram analisados cortes histológicos do parênquima hepático de todos os animais, destacando-se alterações morfológicas portais, observadas nos animais DCN, como provável resultado da deficiência de insulina (Figura 9, página 133)

Tabela 7: Avaliação de parâmetros de função hepática em ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	ALT ^a (U/mL)	AST ^a (U/mL)	GGT ^a (U/mL)	ALP ^a (U/L)	BT ^a (mg/dL)	BI ^a (mg/dL)	BD ^a (mg/dL)
NCN ^g	50,20 ± 1,73	20,33 ± 1,57	9,23 ± 1,92	14,40 ± 1,53	1,07 ± 0,04	0,45 ± 0,12	0,62 ± 0,08
DCN ^b	115,78 ± 6,25*	31,65 ± 2,80*	6,30 ± 1,74	40,47 ± 1,94*	1,57 ± 0,13*	1,05 ± 0,22	0,51 ± 0,17
DG ^c	110,42 ± 8,26*	38,51 ± 1,90*	15,38 ± 2,68*	44,50 ± 4,55*	1,50 ± 0,13*	1,19 ± 0,18	0,31 ± 0,12
DM ^d	59,04 ± 4,25	40,97 ± 2,50*	8,03 ± 3,62	23,52 ± 0,49*	2,29 ± 0,77*	1,89 ± 0,59*	0,40 ± 0,18
DEM ^e	53,74 ± 2,16	21,65 ± 2,11	9,82 ± 3,08	18,88 ± 1,91	1,02 ± 0,07	0,53 ± 0,07	0,48 ± 0,11
DEAE ^f	40,88 ± 6,09	20,83 ± 1,52	9,26 ± 3,05	17,40 ± 2,40	1,26 ± 0,10	1,12 ± 0,07	0,14 ± 0,04
NEM ^h	55,54 ± 0,70	21,23 ± 1,84	10,95 ± 7,36	13,48 ± 1,08	0,81 ± 0,05	0,60 ± 0,08	0,21 ± 0,03
NEAE ⁱ	45,42 ± 5,75	15,28 ± 0,88	3,00 ± 0,34*	14,70 ± 1,09	1,37 ± 0,10	1,04 ± 0,17	0,33 ± 0,08

^a ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, γ -glutamyl-transferase; ALP, fosfatase alcalina; BT, bilirrubina total; BI, bilirrubina indireta; BD, bilirrubina direta. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^f DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ⁱ NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

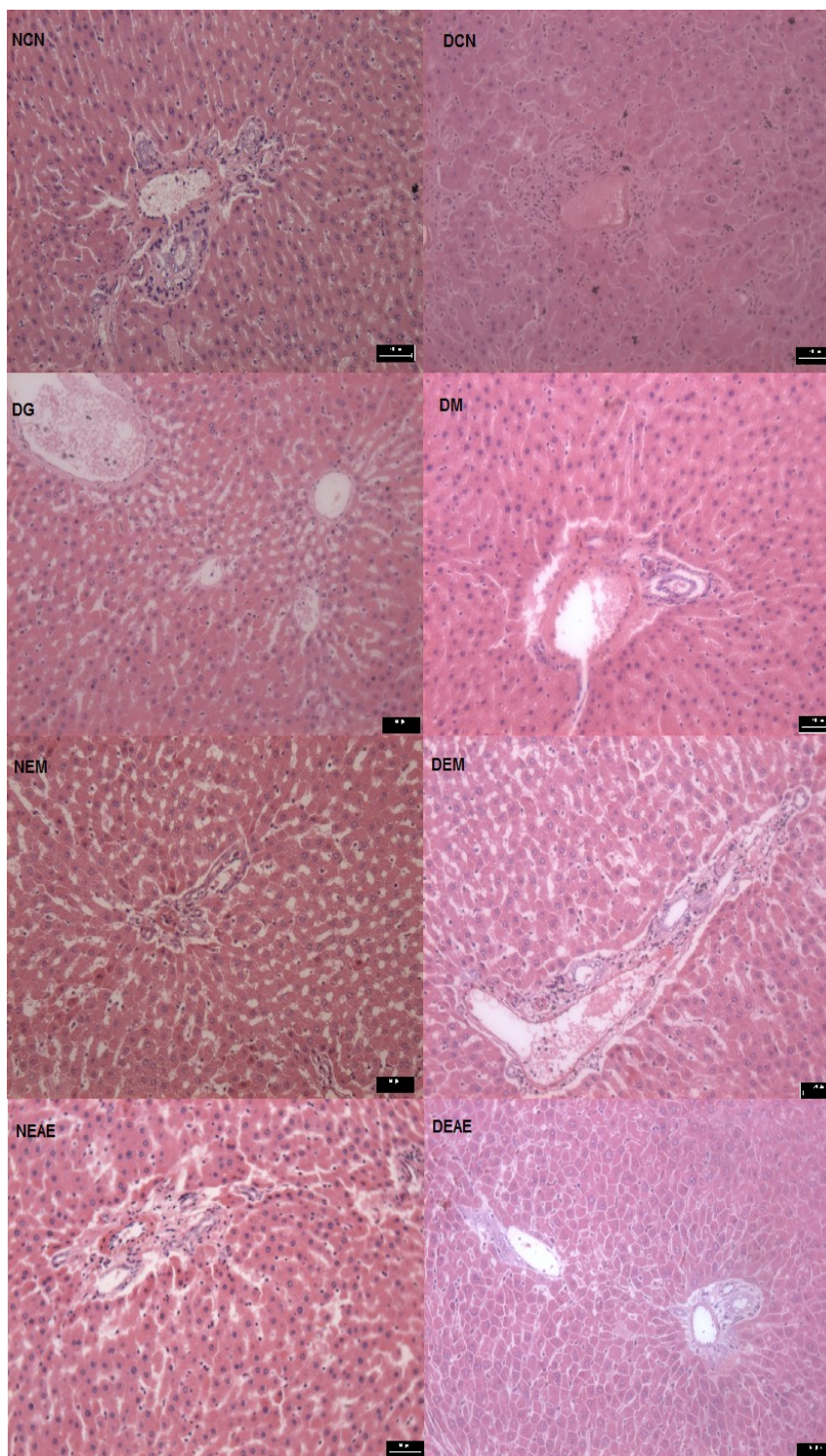


Figura 9: Fotomicrografias histológicas do parênquima hepático (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg).

Biomarcadores enzimáticos como AST, ALT, GGT e ALP são utilizados para avaliação de alterações do parênquima hepático (OHAERI, 2001). Um aumento na atividade dessas enzimas foi observado nos animais diabéticos que não receberam nenhum tipo de tratamento ao longo dos 6 meses de avaliação (grupo DCN). Análises histopatológicas confirmaram esse quadro de alteração hepática nesses animais. A Figura 9 (página 133) mostra alterações morfológicas hepáticas, destacando-se uma intensa proliferação ductal no espaço porta, além da presença de infiltrado inflamatório e áreas de necrose de hepatócitos. De maneira semelhante, foi possível observar discreta proliferação ductal, além da presença de infiltrado inflamatório em algumas áreas de necrose de hepatócitos nos animais diabéticos tratados com glibenclamida e metformina (Figura 9, página 133). Nesses grupos observam-se alterações significativas em pelo menos duas enzimas hepáticas, evidenciando o dano causado ao tecido desses animais. Por outro lado, os animais diabéticos tratados com EM e EAE apresentaram perfis histológicos e enzimáticos comparáveis aos animais normais, refletindo estrutura e função hepáticas dentro dos limites da normalidade.

Por fim, foram avaliados possíveis danos renais por meio de dosagem de ureia e creatinina (Tabela 8, página 135), além da análise de cortes histológicos do córtex renal. Pode-se observar que STZ foi capaz de desencadear uma nefrite cortical intersticial, corpuscular e tubular no grupo DCN (Figura 10, página 136), evidenciado por um aumento significativo dos níveis de ureia (Tabela 8, página 135).

Tabela 8: Avaliação de parâmetros de função renal em ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	Proteína total (g/L)	Albumina (g/L)	Globulina (g/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
NCN^g	5,75 ± 0,87	3,80 ± 0,17	1,95 ± 0,74	46,43 ± 6,02	1,27 ± 0,11
DCN^b	3,86 ± 0,25	2,44 ± 0,26	1,42 ± 0,23	154,06 ± 14,35*	1,26 ± 0,38
DG^c	5,24 ± 0,54	3,56 ± 0,43	1,68 ± 0,32	80,65 ± 7,49*	1,39 ± 0,17
DM^d	4,14 ± 0,18	2,04 ± 0,20	2,10 ± 0,11	99,99 ± 6,93*	1,08 ± 0,04
DEM^e	4,52 ± 0,51	3,29 ± 0,43	1,23 ± 0,33	46,12 ± 1,04	1,34 ± 0,12
DEAE^f	4,01 ± 0,07	2,08 ± 0,16	1,93 ± 0,11	50,49 ± 0,24	1,01 ± 0,02
NEM^h	4,58 ± 0,21	3,04 ± 0,16	1,54 ± 0,37	56,83 ± 3,14	1,27 ± 0,07
NEAEⁱ	5,24 ± 0,54	3,56 ± 0,44	1,68 ± 0,33	62,33 ± 4,19	1,39 ± 0,17

^a DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^f DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg), ⁱ NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

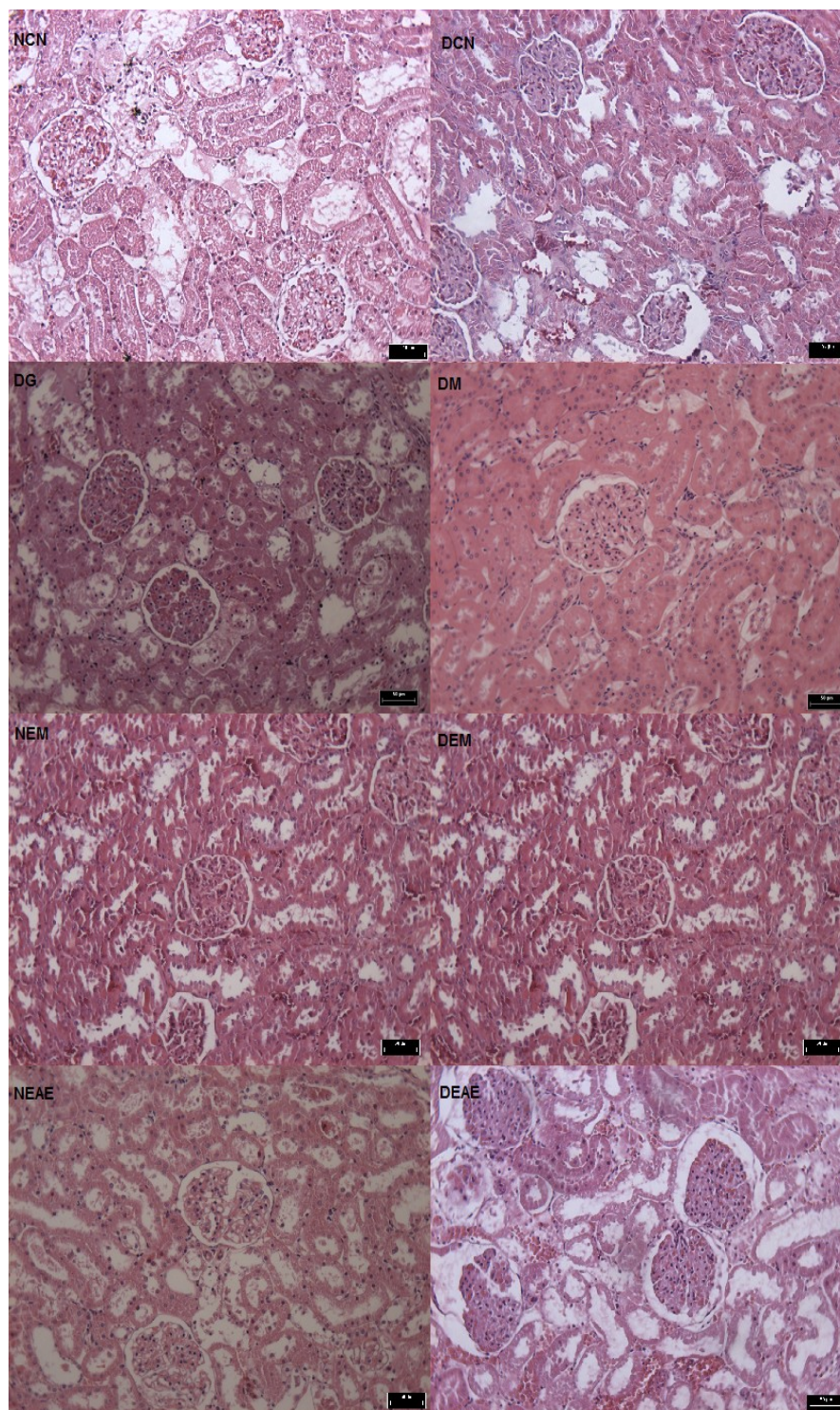


Figura 10: Fotomicrografias histológicas do córtex renal (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg).

Estudos mostraram que a utilização de estreptozocina na indução do diabetes experimental produziu alterações extra pancreáticas, conseqüentes ao estresse oxidativo causado por esta droga. Os resultados indicaram um efeito primário e secundário da STZ no rim de animais induzidos por doses entre 50 e 150 mg/kg. Primariamente, ao causar hiperglicemia, a STZ causou uma dilatação dos túbulos proximais e distais no córtex renal. O efeito secundário, chamado o fator de resposta individual, foi associado a um processo inflamatório local (VALENTOVIC et al., 2006). Essa dupla ação da STZ é uma possível razão para as modificações estruturais observadas nos glomérulos dos ratos DCN. Em DEM e DEAE, não foi observado nenhum dano cortical, intersticial, corpuscular ou tubular (Figura 10, página 136).

Finalmente, foram avaliados os parâmetros hematológicos de todos os animais diabéticos e normais. A análise desses parâmetros é importante na avaliação da toxicidade dos tratamentos, uma vez que determinadas substâncias, incluindo alguns metabólitos secundários como alcaloides e compostos fenólicos, podem causar alterações hematológicas significativas. Como pode-se observar na Tabela 9 (página 138), os animais do grupo DCN apresentaram alterações hematológicas significativas, expressando claramente um quadro de anemia que pode ser decorrente de complicações secundárias do DM no metabolismo férrico, um importante metal na maturação de células sanguíneas. Além disso, o tratamento com EAE reduziu de maneira significativa o número de leucócitos totais. Os demais tratamentos não foram capazes de alterar significativamente nenhum dos parâmetros analisados, confirmando a ausência de toxicidade tanto dos controles positivos quanto de EM para as células sanguíneas.

Tabela 9: Parâmetros hematológicos de ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	Hb ^a (g/dL)	Htm ^a (x 10 ⁶ / uL)	VCM ^a (fL)	HCM ^a (pg)	CHCM ^a (g/dL)	Hct ^a (%)
DCN ^b	10,86 ± 1,04*	5,32 ± 0,48*	72,80 ± 5,90*	20,61 ± 1,31*	28,37 ± 2,22	29,34 ± 3,41*
DG ^c	13,34 ± 0,63	5,67 ± 0,06	71,58 ± 6,06	23,57 ± 1,26	33,56 ± 1,58	40,50 ± 3,34
DM ^d	13,03 ± 0,50	6,26 ± 0,07	71,70 ± 6,29	20,79 ± 0,68	30,26 ± 3,10	44,83 ± 3,94
DEM ^e	16,22 ± 0,22	7,07 ± 0,01	62,95 ± 1,07	22,95 ± 0,31	36,50 ± 0,68	44,50 ± 0,76
DEAE ^f	12,92 ± 0,57	7,10 ± 0,04	61,99 ± 1,72	18,19 ± 0,80	29,41 ± 1,38	44,00 ± 0,97
NCN ^g	16,15 ± 0,81	7,01 ± 0,03	50,33 ± 3,91	23,04 ± 1,19	46,91 ± 3,43	35,33 ± 2,87
NEM ^h	18,41 ± 0,42	7,09 ± 0,03	60,00 ± 0,60	26,00 ± 0,71	43,29 ± 0,76	45,17 ± 1,01
NEAE ⁱ	13,68 ± 0,19	7,22 ± 0,01	64,66 ± 0,24	18,95 ± 1,71	29,36 ± 0,20	46,67 ± 0,41
Grupos	LT ^a (x 10 ³ / uL)	Ba ^a (%)	Eo ^a (%)	Mo ^a (%)	Li ^a (%)	Ne ^a (%)
DCN ^b	6516,67 ± 128,24*	1,00 ± 0,01	2,33 ± 0,42	11,00 ± 1,24	31,33 ± 1,82	54,17 ± 1,77*
DG ^c	5075,00 ± 693,51	1,17 ± 0,17	3,33 ± 1,02	11,17 ± 1,91	34,33 ± 1,56	48,34 ± 2,48
DM ^d	3616,67 ± 590,57*	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,26	7,17 ± 0,91	31,17 ± 3,60*	57,99 ± 3,84
DEM ^e	5608,33 ± 305,35	1,00 ± 0,01	2,83 ± 0,65	13,00 ± 1,46	39,17 ± 2,10	44,00 ± 2,81
DEAE ^f	4050,00 ± 490,24*	1,00 ± 0,01	4,00 ± 1,27	6,67 ± 1,69	28,33 ± 1,28*	60,00 ± 1,80
NCN ^g	5450,00 ± 88,51	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,26	7,33 ± 1,33	38,83 ± 0,75	51,17 ± 2,11
NEM ^h	5475,00 ± 90,14	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,01	7,50 ± 1,03	38,17 ± 1,01	51,33 ± 1,20
NEAE ⁱ	4517,67 ± 754,17*	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,37	5,33 ± 0,56	39,33 ± 0,76	52,32 ± 0,21

^a Hb, Concentração de hemoglobina; Htm, número de células (hematimetria); índices hematimétricos (VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração média da hemoglobina corpuscular); Htc, volume de células (hematócrito); LT, leucometria total; leucometria específica (tipos celulares: Ba, basófilo; Eo, eosinófilo; Mo, monócito; Li, linfócito; Ne, neutrófilo). ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^f DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ⁱ NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

5.2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Cecropia pachystachya* EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Além do efeito citotóxico direto por meio da alcalinização do DNA e consequente depleção dos níveis de ATP nas células pancreáticas, evidências indicam que os radicais livres tem papel essencial no efeito diabetogênico da STZ (TAKASU et al., 1991). Os radicais livres são altamente instáveis e reativos sendo, por essa razão, difíceis de serem mensurados diretamente *in vivo*. Dessa forma, medidas indiretas são utilizadas como forma de avaliação do estresse oxidativo, incluindo a dosagem de enzimas antioxidantes e de produtos da peroxidação lipídica, como é o caso do MDA.

O estresse oxidativo nos animais induzidos por STZ pode ser avaliado, portanto, por meio de enzimas envolvidas no balanço redox da célula, incluindo superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, as quais convertem radicais superóxido em peróxidos ou peróxidos em água e oxigênio. A conversão de peróxido de hidrogênio pela glutathione peroxidase ocorre concomitante com a oxidação da glutathione reduzida para a forma oxidada. O DM pode alterar a atividade dessas enzimas em diversos tecidos (RAUSCHER, SANDERS e WATKINS, 2000). Compostos que podem ser modificados pela ação de radicais livres, como lipídios, proteínas e grupos sulfidrilas, são também usados como medidas indiretas do estresse oxidativo. Nesse trabalho, foram analisadas as concentrações de SOD, CAT e GSH no fígado e cérebro dos ratos diabéticos e normais tratados por 6 meses com controles negativo, positivos, EM ou EAE. Além disso, foram dosados os níveis de MDA, produto da peroxidação lipídica no fígado, cérebro e hemácias desses mesmos animais.

O radical superóxido, o primeiro produto da redução da molécula de oxigênio, tem um elétron desemparelhado em sua órbita externa e isso resulta em uma fonte importante de hidroperóxidos e de radicais livres tóxicos. Uma célula normal tem a habilidade de detoxificar radicais superóxido por meio de enzimas como a superóxido dismutase. A SOD, junto com outras enzimas como a catalase e glutathione reductase, ajuda a manter a concentração de glutathione e NADPH

necessários para a efetiva função dos mecanismos de defesas antioxidantes. Vários trabalhos com animais induzidos com STZ mostraram uma redução da atividade de SOD. Mohan e Das (1998) demonstraram uma redução significativa da atividade de SOD no plasma de ratos diabéticos. Observamos também uma atividade reduzida dessas enzimas nos animais diabéticos do grupo DCN corroborando com os trabalhos em outros modelos experimentais.

Os hidroperóxidos têm um efeito tóxico nas células, diretamente ou por meio de grande degradação de radicais hidroxil tóxicos. Eles também podem reagir com metais de transição e formar aldeídos, como o malondialdeído, que causa danos às membranas celulares. O aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, que é uma evidência indireta da intensa produção de radicais livres, é avaliado em diversos trabalhos com ratos induzidos com estreptozotocina e aloxano (JAIN, 1989; ARAGNO et al., 1999).

Um estresse oxidativo elevado e mudanças na capacidade antioxidante são observados no DM clínico e experimental e podem contribuir para complicações dessa doença (BAYNES, 1991). Como pode-se observar na Tabela 10 (página 141), os animais do grupo DCN apresentaram redução significativa de todas as enzimas antioxidantes, além de um aumento de produtos do estresse oxidativo, expresso aqui em termos de concentração de MDA.

A redução das defesas antioxidantes observada nos animais diabéticos do grupo DCN, ao final dos 6 meses de avaliação pode ser atribuída a um aumento na produção do ânion superóxido, um radical livre. O mecanismo proposto é de que o ânion superóxido se transformaria em peróxido de hidrogênio e formaria o radical hidroxil (MENEHINI, 1987). Como o radical hidroxil é principal iniciador da lipoperoxidação, removeria um átomo de hidrogênio de um ácido poli-insaturado presente na membrana celular e isso determinaria uma elevação na lipoperoxidação, a qual foi avaliada pelo método de TBARS (Tabela 10, página 141).

Tabela 10: Níveis de malonaldeído e enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutatona reduzida, em ratos diabéticos e normais após tratamento com extratos metanólico e em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	MDA (nM/mL) ^a			CAT ^a (U/mL)	SOD ^a (U/mL)	GSH ^a (U/mL)
	Fígado	Cérebro	Hemácia			
DCN^b	12,18 ± 0,75*	12,77 ± 0,39*	51,70 ± 1,01*	0,28 ± 0,06*	0,57 ± 0,20*	0,68 ± 0,21*
DG^c	9,40 ± 1,73*	11,69 ± 0,54*	40,03 ± 4,87*	0,73 ± 0,23*	1,25 ± 0,36*	0,65 ± 0,13*
DM^d	7,64 ± 1,95	17,85 ± 3,65*	31,67 ± 4,98*	2,05 ± 0,46	1,97 ± 0,59*	0,56 ± 0,04*
DEM^e	2,57 ± 0,59	1,51 ± 0,23	25,72 ± 5,90*	4,00 ± 0,84	8,20 ± 0,68*	5,76 ± 0,78*
DEAE^f	1,68 ± 0,03	1,23 ± 0,11	5,54 ± 0,31	6,16 ± 0,45	13,97 ± 0,82	7,77 ± 0,62
NCN^g	1,84 ± 1,18	2,18 ± 0,80	5,84 ± 1,18	4,54 ± 0,66	12,39 ± 1,30	9,07 ± 1,84
NEM^h	1,93 ± 0,35	2,56 ± 0,47	4,35 ± 0,72	2,52 ± 0,34	11,32 ± 1,53	9,16 ± 0,61
NEAEⁱ	2,90 ± 0,76	2,69 ± 0,33	4,82 ± 0,28	5,95 ± 0,89	11,76 ± 0,40	7,64 ± 0,90

^a MDA, malonaldeído; CAT, catalase; SOD, superóxido desmutase; GSH, glutatona redutase. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DEM, animais diabéticos tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^f DEAE, animais diabéticos tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h NEM, animais normais tratados com extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg); ⁱ NEAE, animais normais tratados com extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (80 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Como pode ser observado na Tabela 10 (página 141), os animais diabéticos tratados com EM e EAE não apresentaram as alterações observadas nos grupos DCN, DG e DM, refletindo uma maior estabilidade e integridade do sistema antioxidante desses animais. Nos animais dos grupos DEM e DEAE, é possível observar valores estatisticamente iguais aos parâmetros normais tanto com relação aos níveis de MDA quanto em relação às atividades enzimáticas antioxidantes. Por outro lado, animais diabéticos que foram tratados com glibenclamida e metformina, de maneira semelhante ao grupo DCN, apresentaram elevados níveis de MDA e reduzidas atividades antioxidantes para as 3 enzimas testadas, CAT, SOD e GSH.

A expressiva atividade antioxidante observada nos animais diabéticos tratados com EM e EAE é reflexo de um significativo potencial já mostrado *in vitro*, por meio dos métodos de sequestro de radicais livres (método DPPH), poder de redução e a própria análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (item 5.2.1, página 107). Como mencionado anteriormente, os resultados podem ser atribuídos, em parte, à presença do ácido clorogênico, isoorientina e orientina, compostos identificados e quantificados em ambos os extratos e de reconhecida atividade antioxidante (CHUN et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais o estresse oxidativo elevado está envolvido nas complicações diabéticas são parcialmente conhecidos. Este trabalho mostrou que o modelo animal utilizado constituiu um efetivo modelo experimental para ajudar na elucidação de mecanismos e identificação de terapias adicionais ao tratamento do diabetes.

5.3 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA ORAL CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Cecropia pachystachya*

5.3.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Tendo em vista a potente atividade hipoglicemiante do extrato em acetato de etila (Gráfico 4 e Tabela 4, páginas 117 e 118, respectivamente) e que a atividade antioxidante é um fator importante na prevenção e/ou tratamento de sintomas associados ao diabetes, além de uma ausência de toxicidade apresentada, selecionou-se esse extrato para compor uma formulação líquida oral (FF). Destacando-se por possuírem uma facilidade de administração e estabilidade, as formas farmacêuticas orais são bastante aplicáveis à incorporação de extratos vegetais. O registro de patente dessa formulação foi depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) em 04 de abril de 2013, na categoria Patente de Invenção, com o número BR1020130067334.

Para avaliação do efeito hipoglicemiante crônico dessa formulação, os animais foram submetidos, inicialmente, a uma avaliação da dose ideal do adjuvante carboximetilcelulose (CMC) por meio do teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Conforme mostra a Tabela 11 (página 145), os animais que receberam formulação base CMC 0,5% com EAE 80 mg/kg (grupo DCMC_EAE 0,5%) apresentaram redução significativa das glicemias em todos os pontos da curva do TOTG (Gráfico 6B, página 144). Nas demais concentrações de CMC (0,2; 0,8 e 1,0%) não foi observado o mesmo tipo de resposta. Para as concentrações de 0,2 e 0,8% de CMC (Gráficos 6A e 6C, respectivamente), observou-se redução significativa apenas nos tempos de 6 e 24 horas após o tratamento inicial. Já na concentração de 1,0% (Gráfico 6D, página 144) não foi observada nenhuma redução significativa da glicemia em todos os pontos da curva.

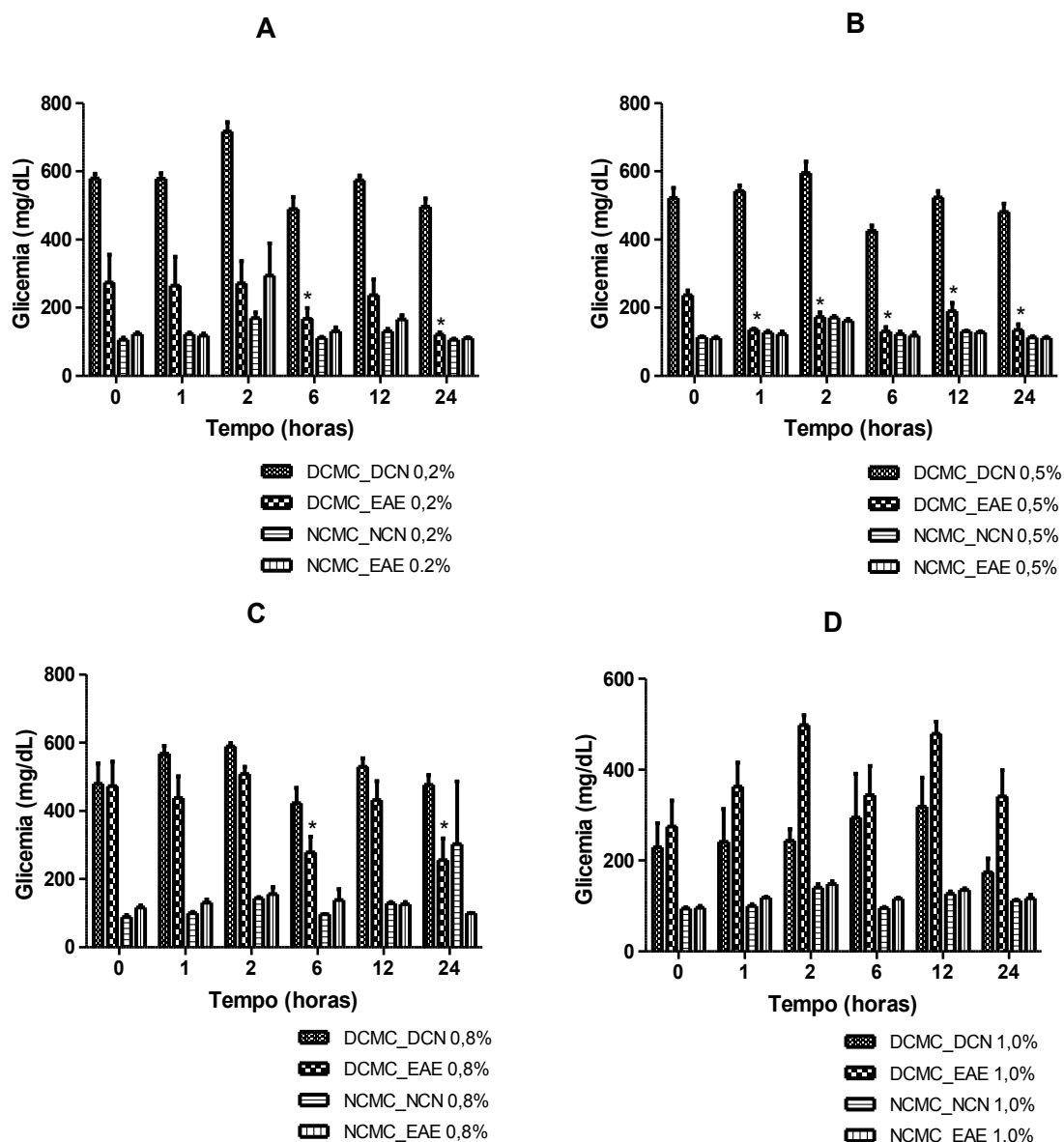


Gráfico 6: Atividade hipoglicemiante de uma formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya*. Avaliação da concentração ideal de carboximetilcelulose (CMC). Teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O tempo 0 corresponde à medida da glicemia de jejum. Os tempos 1, 2, 4, 6, 12 e 24 correspondem às glicemias medida 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração do controle negativo ou dos tratamentos referentes a cada grupo. **A** formulação base CMC 0,2%, **B** formulação base CMC 0,5%, **C** formulação base CMC 0,8%, **D** formulação base CMC 1,0%. DCMC_DCN, ratos diabéticos controle negativo tratados com formulação base CMC; DCMC_EAE, ratos diabéticos tratados com formulação base CMC contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* 80 mg/kg; NCMC_NCN, ratos normais controle negativo tratados com formulação base CMC; NCMC_EAE, ratos normais tratados com formulação base CMC contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* 80 mg/kg. *representa redução significativa ($p < 0,05$) da glicemia em relação ao tempo 0.

Tabela 11: Porcentagens de redução da glicemia dos animais diabéticos tratados com formulações farmacêuticas contendo diferentes concentrações de carboximetilcelulose (CMC) ao longo do TOTG

Tratamentos ^a	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 6	Tempo 12	Tempo 24
DCMC_EAE 0,2%	ns	ns	39%	ns	56%
DCMC_EAE 0,5%	43%	30%	45%	20%	43%
DCMC_EAE 0,8%	ns	ns	41%	ns	46%
DCMC_EAE 1,0%	ns	ns	ns	ns	ns

^aDCMC_EAE = grupos de animais diabéticos que foram tratados com formulação base em diferentes concentrações de CMC contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* 80 mg/kg, ns = redução não significativa da glicemia em relação à glicemia de jejum.

O Gráfico 7 (página 145) mostra as diferentes concentrações de CMC sendo comparadas somente ao seu respectivo grupo diabético controle negativo.

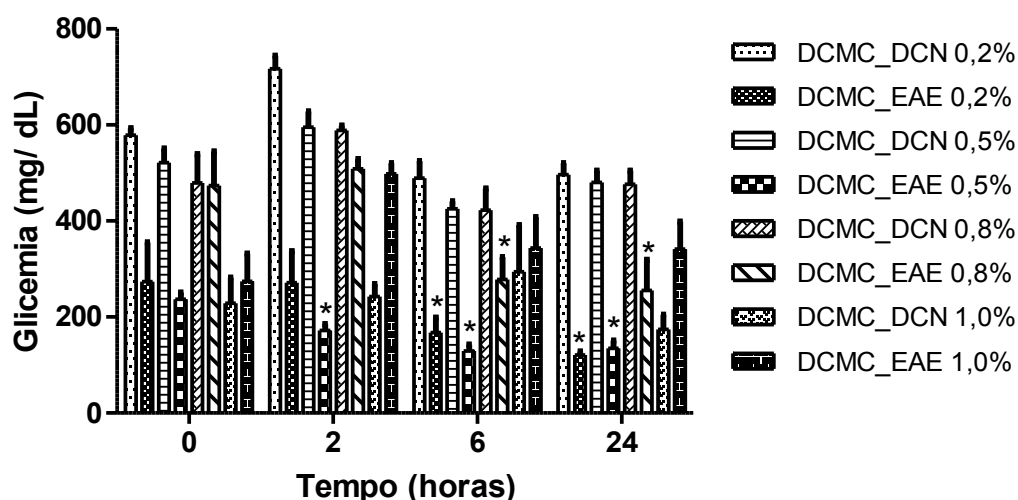


Gráfico 7: Avaliação da concentração ideal de carboximetilcelulose (CMC). Teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O tempo 0 corresponde à medida da glicemia de jejum. Os tempos 2, 6 e 24 correspondem às glicemias medida 2, 6 e 24 horas após a administração do controle negativo ou dos tratamentos referentes a cada grupo. DCMC_DCN, ratos diabéticos controle negativo tratados com formulação base CMC; DCMC_EAE, ratos diabéticos tratados com formulação base CMC contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* 80 mg/kg. *representa redução significativa ($p < 0,05$) da glicemia em relação ao tempo 0.

Sabe-se que adjuvantes de viscosidade, como a CMC, podem alterar o tempo de liberação de um fármaco adicionado à formulação. Essa inibição pode ser tal que, ocorre a inibição total da liberação do fármaco por complexação com moléculas da própria CMC (ALLEN Jr, 1998 e 2000). A análise dos Gráficos 5 e 6 mostra essa alteração na liberação de EAE nas concentrações de 0,2; 0,8 e 1,0% de CMC. No primeiro caso (0,2%), a quantidade de adjuvante não foi suficiente para manter uma lenta liberação de EAE. Por outro lado, nas duas outras concentrações (0,8 e 1,0%) a ausência de efeito hipoglicemiante ao longo do TOTG pode ser explicada pela complexação das moléculas de CMC com EAE, inibindo, total ou parcialmente sua liberação no organismo para a ação desejada.

Após ser determinada a concentração ideal do adjuvante CMC foi avaliada a dose ideal de EAE a ser acrescentada ao formulação base CMC (Gráfico 8, página 147) a fim de se reduzir a quantidade de EAE utilizado, sem alteração de seu efeito hipoglicemiante. Após uma única administração foi possível observar que a glicemia de jejum dos animais submetidos a um tratamento com um formulação base CMC com EAE na concentração de 20 mg/kg reduziu mais de 30% ($p < 0,05$) do seu valor inicial, ou seja, quando tais animais ainda não estavam sendo submetidos ao tratamento com formulação base CMC com EAE (Gráfico 8, página 147). Essa redução foi significativamente maior que a redução que ocorreu quando animais diabéticos foram tratados com drogas de referência como metformina e glibenclamida (dados não mostrados).

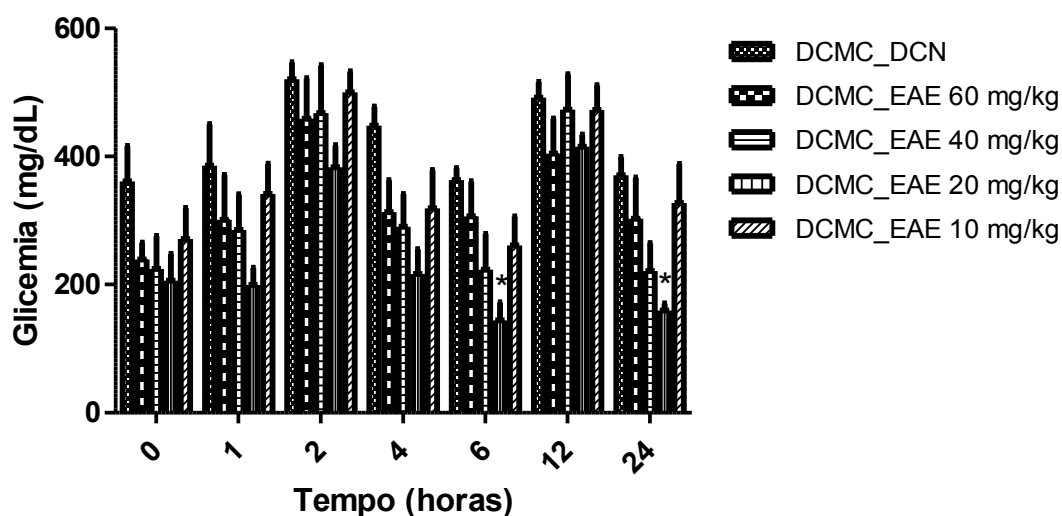


Gráfico 8: Definição da dose ideal do extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya*. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG). O tempo 0 corresponde à medida da glicemia de jejum. Os tempos 1, 2, 4, 6, 12 e 24 correspondem às glicemias medida 1, 2, 4, 6, 12 e 24 horas após a administração do controle negativo ou dos tratamentos referentes a cada grupo. DCMC_DCN, ratos diabéticos controle negativo tratados com formulação base CMC; DCMC_EAE, ratos diabéticos tratados com formulação base CMC contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* nas concentrações de 10, 20, 40 e 60 mg/kg. *representa redução significativa ($p < 0,05$) da glicemia em relação ao tempo 0.

Ao contrário do que se esperava, doses de EAE maiores que 20 mg/kg na FF não foram capazes de reduzir significativamente a glicemia dos animais diabéticos. Isso pode ser parcialmente explicado pela saturação de receptores envolvidos no mecanismo de ação desse extrato (ainda não elucidado). Essa saturação em concentrações maiores já foi observada para outras espécies de plantas, em outras atividades biológicas (LEE et al., 2010). Um outro possível mecanismo não envolve a saturação de receptores, e sim, um antagonismo não competitivo entre o fármaco analisado e outras substâncias do organismo (WILLIAMSON, OKPAKO e EVANS, 1996). Segundo esses autores, em um antagonismo não competitivo, a maior dose do agonista não reflete, necessariamente, uma maior resposta. Porém, nesses casos, respostas mais efetivas são inibidas ou reduzidas na presença de um antagonista. Extratos brutos de plantas, de uma maneira geral, respondem dessa forma ao aumento da sua concentração. Segundo esses autores, a redução da efetividade de resposta em altas concentrações pode estar relacionada ainda à interação com mensageiros intracelulares secundários que levarão ao bloqueio dessa resposta (ZHOU et al., 2012).

Além disso, o uso de um agente de alta viscosidade como a carboximetilcelulose aumentou a biodisponibilidade de EAE, reduzindo a dose terapêutica necessária para produzir o mesmo efeito observado quando esse extrato foi administrado em uma solução aquosa, em duas doses diárias. Como pode ser observado no item 5.2.2, a dose efetiva de EAE em solução aquosa foi de 80 mg/kg, duas vezes ao dia. Ao ser incorporado em uma formulação farmacêutica contendo CMC, porém, esse mesmo extrato produziu efeito hipoglicemiante estatisticamente igual ao observado para o tratamento com solução aquosa, porém com uma dose quatro vezes menor (20 mg/kg) e em uma única dose diária.

5.3.2 ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE CRÔNICA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

A evolução glicêmica dos animais diabéticos e normais, de maneira semelhante ao que já havia sido realizado para EM e EAE, foi expressa em um gráfico de área sob a curva. Sendo assim, elevados valores de glicemia apresentaram áreas em torno de 3000, conforme observado nos grupos DCN e DG.

O tratamento crônico com FF proporcionou uma redução de aproximadamente 70% da glicemia de jejum (Gráfico 9, página 149), ao final dos 6 meses de tratamento, em relação à glicemia inicial dos mesmo animais, quando esses tinham sido submetidos à indução com estreptozotocina, mas ainda não tinham iniciado o tratamento com doses diárias de FF. O mesmo comportamento pode ser observado quando são administradas duas doses diárias de um hipoglicemiante oral de referência, utilizado aqui como um dos controles positivos – a metformina. Além disso, animais diabéticos que foram tratados com outro controle positivo, a glimepirida, em uma única dose diária, também tiveram as glicemias mantidas ao longo do período avaliado.

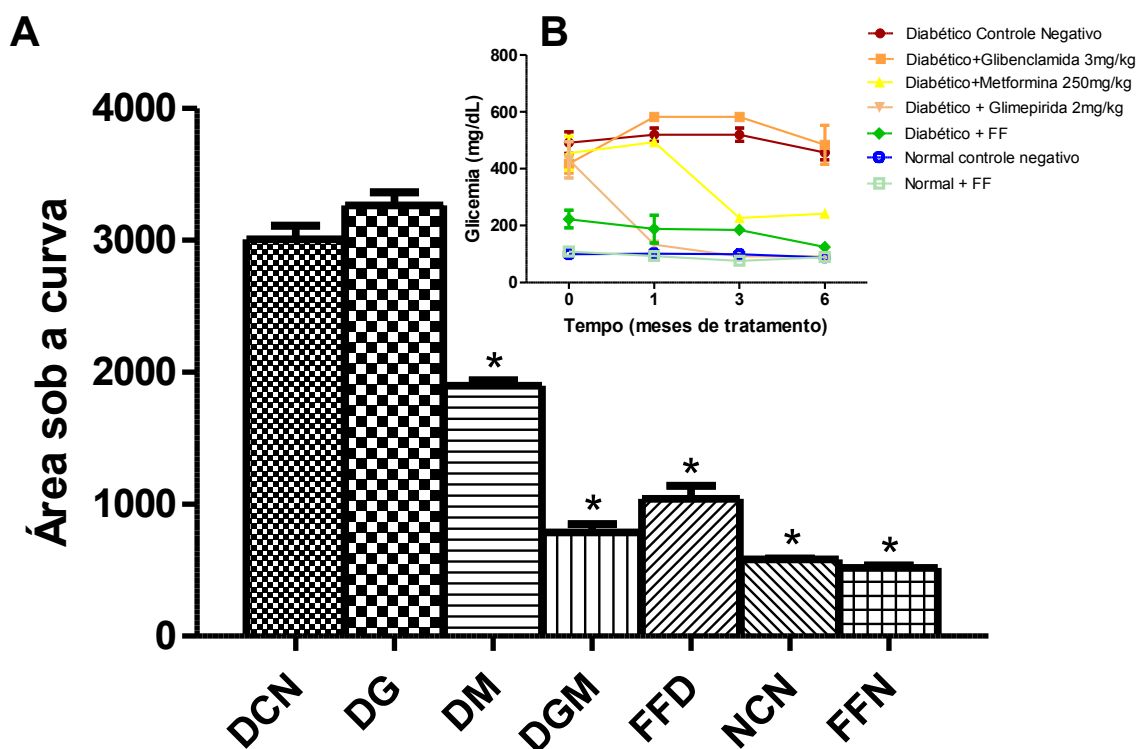


Gráfico 9: **A** Área sob a curva dos níveis de glicemia em ratos diabéticos e normais após a indução com estreptozotocina 40 mg/kg i.v. (tempo 0) e após 1, 3 e 6 meses de tratamento (tempos 1, 3 e 6) com a formulação farmacêutica oral de *Cecropia pachystachya* Trécul e controles negativo e positivos. **B** Níveis glicêmicos em ratos diabéticos e normais após a indução com estreptozotocina 40 mg/kg i.v. (tempo 0) e após 1, 3 e 6 meses de tratamento (tempos 1, 3 e 6) com a formulação farmacêutica oral de *Cecropia pachystachya* Trécul e controles negativo e positivos. DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) da glicemia quando comparada ao grupo DCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

A análise de hemoglobina glicada e frutossamina é reflexo dessa estabilidade glicêmica ao longo dos 6 meses de tratamento. Conforme pode ser observado na Tabela 12 (página 150), os animais que foram tratados com FF, assim como já havia sido observado para EAE (Tabela 5, página 124) apresentaram níveis significativamente reduzidos de hemoglobina glicada e frutossamina. O mesmo foi observado para os animais que foram tratados com uma dose de glimepirida e duas doses diárias de metformina.

No entanto, em animais tratados com glibenclamida foram encontrados níveis elevados de ambos parâmetros, refletindo a instabilidade glicêmica desse grupo. Isso pode ser confirmado pela análise da glicemia de jejum dos animais do grupo DG que, ao final de 6 meses de tratamento, não mostrou redução significativa (Gráfico 9, página 149). Além disso, observou-se no decorrer do tratamento uma considerável piora no seu estado geral. Tais animais apresentaram-se apáticos com intensa queda de pelo.

Tabela 12: Níveis de insulina, frutossamina, glicose-6-fosfatase e glicogênios hepático e muscular de animais diabéticos e normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	Insulina ($\mu\text{g/mL}$)	HbA1c (% total Hb) ^a	Frutossamina (mM/L)	Glicose-6- fosfatase (nM Pi/mg proteína)	Glicogênio hepático ($\mu\text{M/L}$)	Glicogênio muscular ($\mu\text{M/L}$)	Lactato (mg/dL)
DCN ^b	4,54 \pm 0,06*	19,16 \pm 2,03*	3,96 \pm 0,63*	14,26 \pm 0,47	45,90 \pm 7,11*	40,63 \pm 5,37*	114,44 \pm 5,71*
DG ^c	6,07 \pm 1,36*	12,09 \pm 0,23*	3,09 \pm 0,23*	9,92 \pm 0,38*	45,72 \pm 7,21*	50,09 \pm 6,17*	100,59 \pm 6,77*
DM ^d	4,73 \pm 0,16*	1,01 \pm 0,09	1,01 \pm 0,09	16,95 \pm 1,30	41,74 \pm 5,85*	40,56 \pm 9,00*	50,76 \pm 7,98*
DGM ^e	8,17 \pm 0,67	5,07 \pm 0,24	1,54 \pm 0,09	11,65 \pm 1,52	166,68 \pm 11,54*	67,37 \pm 8,94*	19,83 \pm 0,46
FFD ^f	9,06 \pm 1,04	3,23 \pm 0,22	0,94 \pm 0,13	2,72 \pm 0,52*	230,60 \pm 24,12*	149,65 \pm 5,90*	19,13 \pm 0,56
NCN ^g	9,50 \pm 1,22	1,95 \pm 0,14	0,91 \pm 0,03	14,49 \pm 1,24	218,13 \pm 10,51	120,53 \pm 7,83	18,83 \pm 0,46
FFN ^h	10,19 \pm 0,28	2,10 \pm 0,13	0,96 \pm 0,05	3,44 \pm 0,34*	209,56 \pm 22,20	127,05 \pm 6,83	19,46 \pm 0,75

^a HbA1c, Hemoglobina glicada. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); ^f FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa ($p < 0,01$) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Como pode ser ainda observado na Tabela 12 (página 150), o tratamento com FF manteve os níveis elevados de glicogênios hepático e muscular, além do padrão de inibição da enzima glicose-6-fosfatase já apresentados por EAE (Tabela 5, página 124). Por fim, observa-se ainda um aumento nos níveis plasmáticos de insulina nos animais tratados com FF que ratifica o que já havia sido observado com os animais tratados com EAE. O aumento desse hormônio é reflexo de uma aparente hiperplasia das ilhotas pancreáticas observada nesse grupo, de maneira semelhante ao que já havia sido observado para EAE. Os animais diabéticos tratados com glibemipirida apresentaram resultados semelhantes àqueles tratados com FF (Figura 11, página 151).

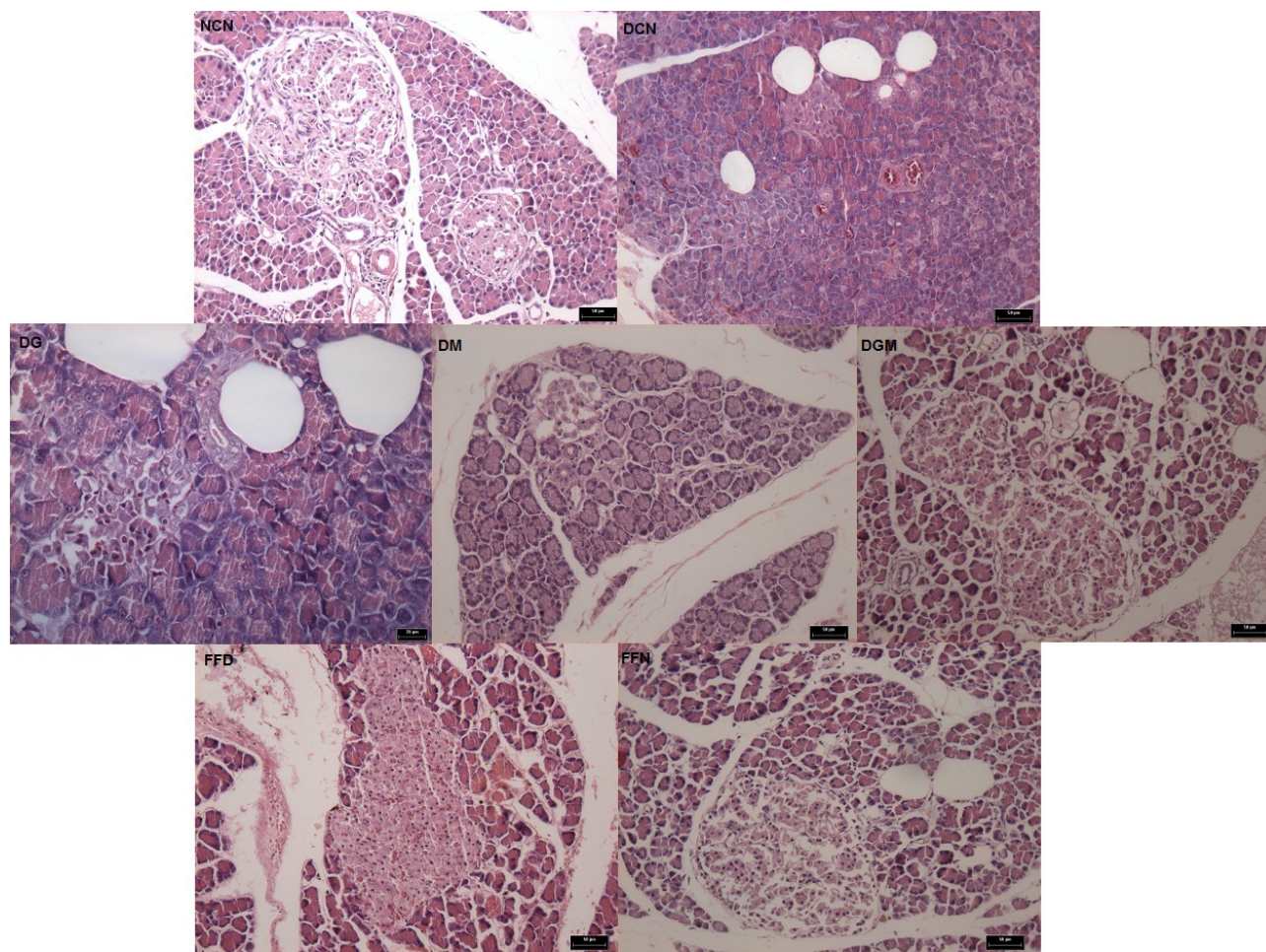


Figura 11: Fotomicrografias histológicas de cortes pancreáticos (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibemclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DGM, animais diabéticos tratados com glibemipirida (2 mg/kg); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg).

Apesar das semelhanças nos resultados apresentados por EAE e FF, destaca-se aqui a redução da dose terapêutica do extrato em acetato de etila quando incorporado à formulação farmacêutica. Enquanto a solução aquosa de EAE apresentou significativa atividade hipoglicemiante na concentração de 80 mg/kg, em FF foram utilizados apenas 20 mg/kg do mesmo extrato, reproduzindo o semelhante efeito hipoglicemiante. Como já mencionado anteriormente, a redução da dose terapêutica se deve, em parte, à presença de um agente de alta viscosidade entre os componentes da formulação, a CMC.

Sabe-se que devido às suas propriedades de solubilidade em água fria e quente, ao aumento da viscosidade em solução, à habilidade em formar filme, à adesividade, às características de suspensão, à retenção da água, à resistência a óleos, gorduras e solventes orgânicos, a CMC tem uma ampla aplicação na formulação de diversos medicamentos e produtos alimentícios (ALHAMDAN e SASTRY, 1990; PILIZOTA, SUBARIC e LOVRIC, 1996).

Sendo assim, devido à sua capacidade em formar polímeros bioadesivos, a CMC é capaz de se ligar a substratos biológicos de duas maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos). A bioadesão é uma propriedade explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência de um medicamento no organismo. Em consequência, a biodisponibilidade dos fármacos pode ser melhorada e o número de doses tomadas, diariamente, pode ser reduzido. Outra vantagem é que a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica dos fármacos (ASANE et al., 2008; ANDREWS, LAVERTY e JONES, 2009).

Portanto o uso de CMC na formulação foi imprescindível para a determinação de uma menor dose terapêutica do extrato em acetato de etila na elaboração da formulação farmacêutica. Dessa forma, a incorporação em uma formulação à base de CMC aumentou a absorção do extrato no intestino, melhorando sua biodisponibilidade.

Um dos sintomas recorrentes em alguns pacientes diabéticos, especialmente os do tipo 1, é a perda de massa corporal de maneira rápida e progressiva. Uma redução significativa ($p < 0,05$) foi observada nos animais diabéticos controle negativo, aqueles que receberam apenas o veículo de FF. Isso se deve a um aumento no consumo de proteínas estruturais em decorrência das alterações no metabolismo de carboidratos, quadro característico do DM tipo 1 (CHEN e IANUZZO, 1982). Por outro lado, os animais que foram tratados com FF contendo EAE não apresentaram redução significativa do peso corporal ao longo dos 6 meses de tratamento (Gráfico 10, página 154).

Também os animais tratados com metformina apresentaram redução progressiva da massa corporal (Gráfico 10, página 154). Sabe-se que as biguanidas, principalmente a metformina, não são isentas de efeitos colaterais. A metformina, em altas doses, pode reduzir a responsividade das células B pancreáticas ao aumento de glicose (KEFAS *et al*, 1996). Além disso, ao longo do tratamento, foram observados anorexia e diarreia. Ressalta-se aqui o fato de que animais que foram tratados com uma dose diária desse hipoglicemiante apresentaram um desequilíbrio glicêmico bastante significativo (dados não mostrados), apresentando elevadas médias de glicemias de jejum durante todo o período de tratamento, acompanhada de uma piora significativa do seu estado geral. No entanto, no grupo de animais que foram tratados com duas doses diárias de metformina, houve, além da redução significativa de aproximadamente 50% ($p < 0,05$) da glicemia de jejum (Gráfico 9, página 149), uma manutenção desse estado geral ao longo dos 6 meses de tratamento. Nesses animais observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) também nos consumos de água e ração (Gráfico 10, página 154).

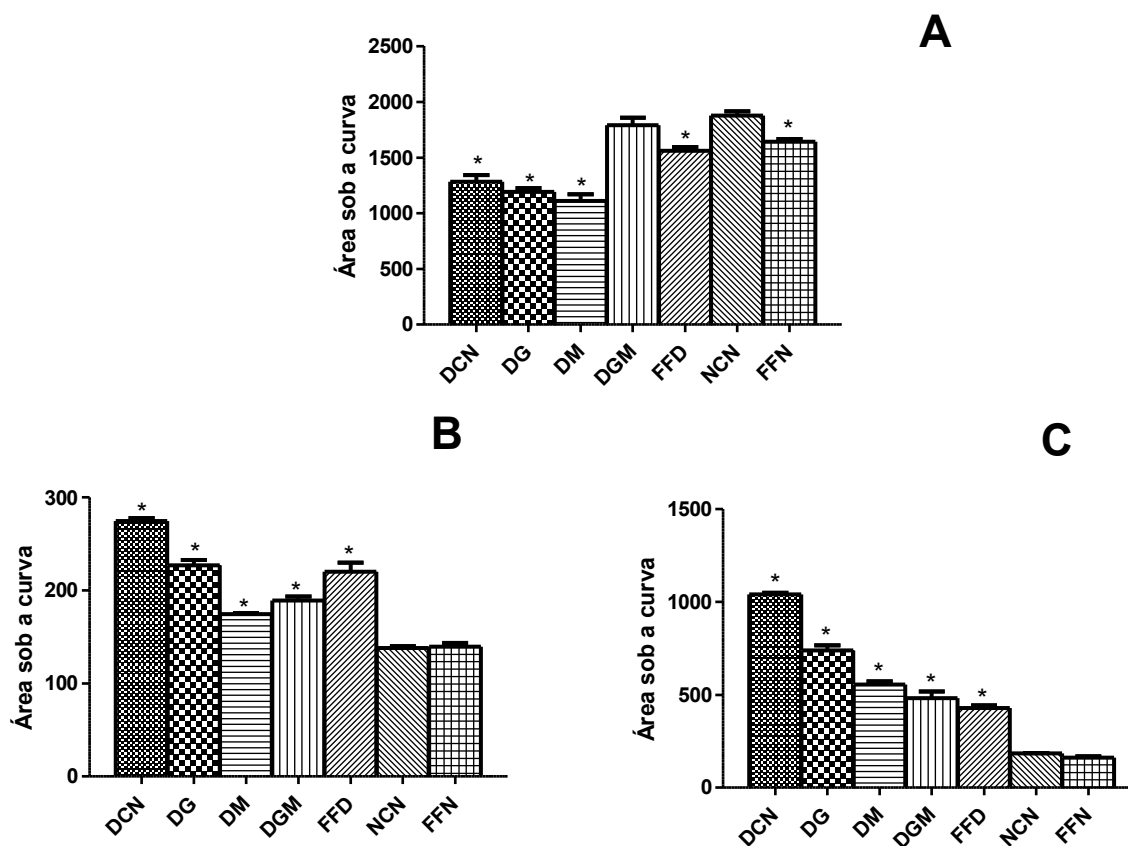


Gráfico 10: Área sob a curva de evolução da massa corporal (**A**), consumo de ração (**B**) e consumo de água (**C**) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos. DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DGM, animais diabéticos tratados com glibepirida (2 mg/kg); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

O consumo de água e ração são também parâmetros importantes a serem monitorados durante uma avaliação de efeito hipoglicemiante. O tratamento com FF contendo EAE reduziu significativamente ($p < 0,05$) os consumos de água e ração (Gráfico 10, página 154), consequências diretas do controle glicêmico desses animais ao longo dos 6 meses de tratamento.

Sabe-se que a polifagia é uma das 3 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). Além disso, 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). O tratamento com FF reduziu significativamente ($p < 0,05$) os consumos de água e ração (Gráfico 10, página 154), consequências diretas do controle glicêmico desses animais ao longo dos 6 meses de tratamento.

Analisando todos os resultados apresentados acima, é possível observar que, de maneira semelhante à glimepirida, enquanto é necessário apenas uma dose diária de FF para manter os índices glicêmicos e outros parâmetros, como hemoglobina glicada e frutossamina em níveis considerados normais, o mesmo só é possível com duas doses diárias de metformina, uma biguanida com reconhecido efeito hipoglicemiante oral.

A toxicidade crônica de FF foi também avaliada por meio de parâmetros bioquímicos e hematológicos, além de análises de cortes histológicos dos tecidos cardíaco, hepático e renal. Como pode ser observado nas Tabelas 13, 14, 15 e 16, (páginas 156, 159, 161 e 164, respectivamente) FF não alterou nenhum dos parâmetros analisados, de maneira semelhante ao que já havia sido observado para EAE (Tabelas de 6 a 9, páginas 128, 132, 135 e 138, respectivamente). Por outro lado, animais diabéticos do grupo DCN e DG apresentaram alterações em parâmetros bioquímicos de avaliação hepática e/ ou renal, além de aumentos significativos nos seus perfis lipídicos (triglicérides, colesterol total e colesterol LDL).

Tabela 13: Perfil lipídico de ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	CT ^a	LDL ^a	VLDL ^a	HDL ^a	TG ^a
DCN ^b	154,22 ± 6,64*	104,40 ± 6,73*	28,44 ± 1,05*	21,38 ± 1,92*	142,22 ± 5,27*
DG ^c	168,03 ± 9,14*	126,38 ± 9,85*	22,42 ± 2,48	19,23 ± 2,09*	112,11 ± 12,41
DM ^d	142,96 ± 16,49*	75,29 ± 8,35*	15,67 ± 2,21	50,71 ± 8,83*	78,35 ± 11,06
DGM ^e	106,20 ± 4,48	59,68 ± 2,98*	21,44 ± 0,89	25,08 ± 1,11	107,18 ± 4,47
FFD ^f	104,14 ± 4,21	30,32 ± 4,07	16,21 ± 1,98	57,61 ± 1,38*	81,05 ± 9,91
NCN ^g	89,36 ± 5,87	34,79 ± 5,39	17,98 ± 1,41	36,59 ± 1,66	89,88 ± 7,07
FFN ^h	107,94 ± 8,34	32,34 ± 4,01	16,30 ± 1,53	59,30 ± 1,70*	81,51 ± 7,63

^a CT, colesterol total; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos. Todos os parâmetros estão expressos em mg/dL. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); ^f FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa (p<0,01) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

De maneira semelhante ao que já havia sido observado para EAE (Tabela 6, página 128), animais diabéticos tratados FF apresentaram um perfil lipídico próximo àquele apresentado por animais normais que receberam o mesmo tratamento, destacando-se também a elevação significativa dos níveis de HDL. Como já mencionado, níveis elevados de HDL refletem a capacidade cardioprotetora exercida por esse tratamento. Nos animais diabéticos do grupo DCN, porém, houve uma alteração significativa em todo o perfil lipídico, com elevações nos níveis de colesterol total, LDL e VLDL, triglicerídeos e redução de HDL. O quadro condiz com os achados histológicos desse grupo que apresentou, de maneira semelhante ao estudo anterior (Figura 8, página 131), alterações vasculares, ectasia e congestão vascular, além de um aumento na espessura das fibras miocárdicas (Figura 12, página 157). Além dessas alterações, observou-se em diversos animais desse grupo um processo inflamatório condizente com uma pericardite, provavelmente secundária ao estresse oxidativo acumulado ao longo dos 6 meses de hiperglicemia

(Figura 13, página 158).

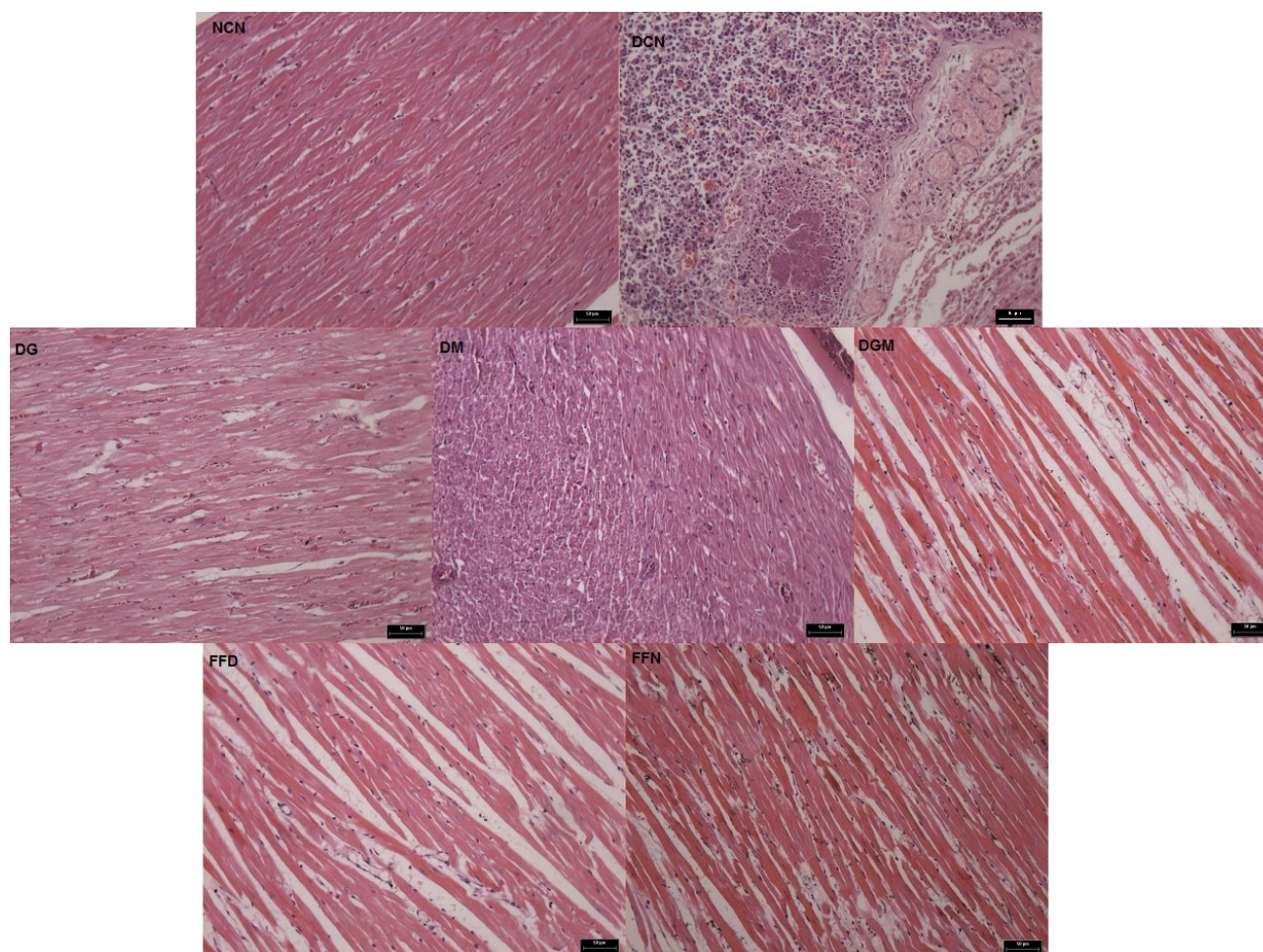


Figura 12: Fotomicrografias histológicas do tecido muscular cardíaco (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg).

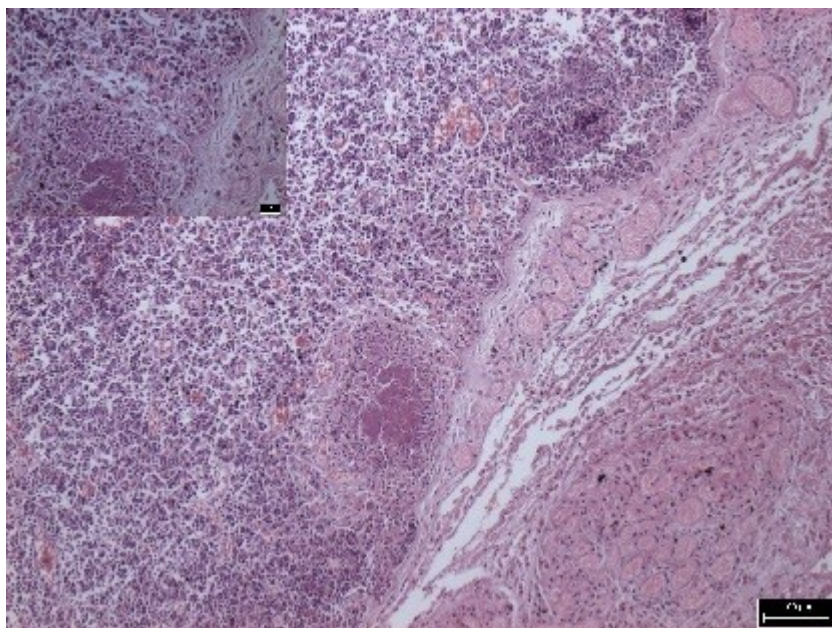


Figura 13: Fotomicrografia histológica do tecido muscular cardíaco (H&E 200x, em destaque 400X) de animais do grupo DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo), mostrando pericardite.

As enzimas AST, ALT, GGT e ALP foram utilizadas como parâmetros de avaliação da função hepática (Tabela 14, página 159). Como pode ser verificado não houve nenhuma alteração significativa dos parâmetros analisadas tanto nos animais diabéticos quanto naqueles normais que receberam FF. No entanto, animais diabéticos dos grupos DCN, DG e DM apresentaram alterações significativas em pelo menos uma das enzimas do perfil de avaliação hepática.

Tabela 14: Avaliação de parâmetros de função hepática em ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	ALT ^a (U/mL)	AST ^a (U/mL)	GGT ^a (U/mL)	ALP ^a (U/L)	BT ^a (mg/dL)	BI ^a (mg/dL)	BD ^a (mg/dL)
DCN ^b	115,78 ± 6,25*	31,65 ± 2,80*	6,30 ± 1,74	40,47 ± 1,94*	1,57 ± 0,13*	1,05 ± 0,22	0,51 ± 0,17
DG ^c	110,42 ± 8,26*	38,51 ± 1,90*	15,38 ± 2,68*	44,50 ± 4,55*	1,50 ± 0,13*	1,19 ± 0,18	0,31 ± 0,12
DM ^d	59,04 ± 4,25	40,97 ± 2,50*	8,03 ± 3,62	23,52 ± 0,49*	2,29 ± 0,77*	1,89 ± 0,59*	0,40 ± 0,18
DGM ^e	38,56 ± 2,79	94,08 ± 6,03	12,03 ± 1,83	22,89 ± 3,73*	1,31 ± 0,12	0,83 ± 0,03	0,48 ± 0,12
FFD ^f	33,87 ± 4,29	17,48 ± 3,77	9,26 ± 0,89	17,98 ± 3,95	1,07 ± 0,15	0,72 ± 0,04	0,28 ± 0,07
NCN ^g	50,20 ± 1,73	20,33 ± 1,57	9,23 ± 1,92	14,40 ± 1,53	1,07 ± 0,04	0,45 ± 0,12	0,62 ± 0,08
FFN ^h	46,72 ± 2,08	26,80 ± 5,21	10,41 ± 1,21	14,43 ± 1,14	1,83 ± 0,11	1,15 ± 0,14	0,69 ± 0,18

^a ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, γ -glutamil-transferase; ALP, fosfatase alcalina; BT, bilirrubina total; BI, bilirrubina indireta; BD, bilirrubina direta. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); ^f FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa ($p < 0,01$) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

A análise do parênquima hepático foi uma ferramenta adicional de avaliação de possíveis danos ao fígado dos animais diabéticos e normais tratados com FF por 6 meses (Figura 14, página 160). Como pode ser observado não há nenhuma alteração histológica significativa nesses animais, ao contrário do observado para aqueles do grupo DCN que, mais uma vez evidenciaram um alargamento do espaço portal em associação com uma proliferação ductal.

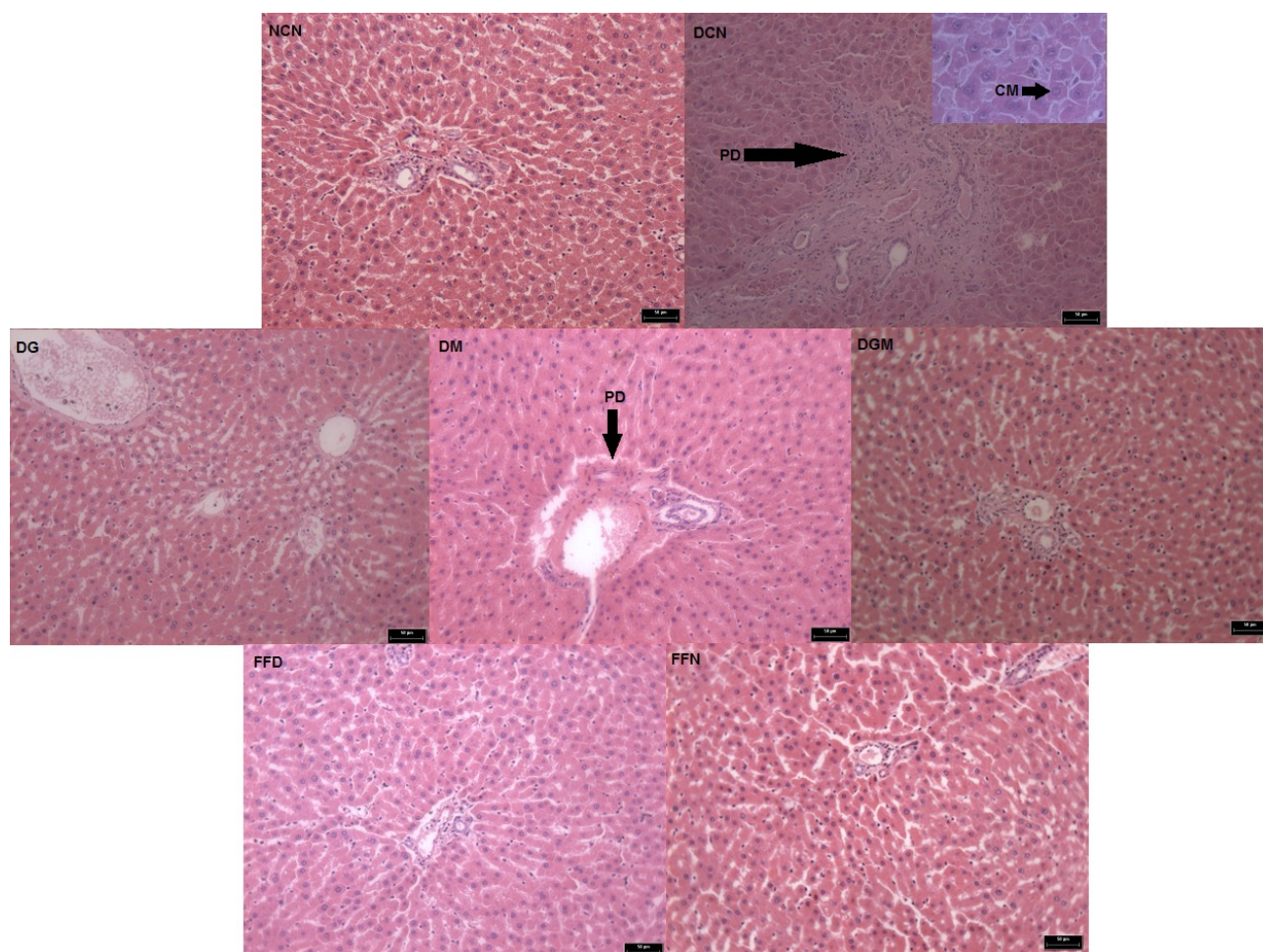


Figura 14: Fotomicrografias histológicas do parênquima hepático (H&E 200x). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Setas indicam **PD**, proliferação ductal, **CM**, cromatina marginalizada

O perfil proteico foi utilizado para a avaliação tanto de possíveis danos ao metabolismo de proteínas e inversões da proporção albumina/globulina, quanto como ferramenta auxiliar de avaliação de danos hepáticos. A Tabela 15 (página 161) mostra que não foram observadas alterações significativas em nenhum dos grupos testados.

Além disso, foram dosados, ainda, os níveis de ureia e creatinina a fim de se relacionar alterações renais nos animais diabéticos e normais tratados com FF (Tabela 15, página 161). De maneira semelhante ao que já havia sido observado para EAE não houve alterações significativas nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina para os grupos FFD e FFN.

Tabela 15: Avaliação de parâmetros de função renal em ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	Proteína total (g/L)	Albumina (g/L)	Globulina (g/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
DCN ^a	3,86 ± 0,25	2,44 ± 0,26	1,42 ± 0,23	154,06 ± 14,35*	1,26 ± 0,38
DG ^b	5,24 ± 0,54	3,56 ± 0,43	1,68 ± 0,32	80,65 ± 7,49*	1,39 ± 0,17
DM ^c	4,14 ± 0,18	2,04 ± 0,20	2,10 ± 0,11	99,99 ± 6,93*	1,08 ± 0,04
DGM ^d	5,25 ± 0,23	2,80 ± 0,16	2,45 ± 0,14	59,83 ± 0,59	1,11 ± 0,02
FFD ^e	5,45 ± 0,28	3,84 ± 0,34	1,61 ± 0,42	49,09 ± 0,59	0,55 ± 0,17
NCN ^f	5,75 ± 0,87	3,80 ± 0,17	1,95 ± 0,74	46,43 ± 6,02	1,27 ± 0,11
FFN ^g	5,71 ± 0,36	4,34 ± 0,32	2,05 ± 0,36	66,46 ± 1,92	0,67 ± 0,02

^a DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^b DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^c DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^d DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); ^e FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^f NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^g FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa (p<0,01) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

A ausência de toxicidade renal de FF foi confirmada por meio de análises de cortes histológicos do córtex renal de animais que receberam esse tipo de tratamento, onde não se observa nenhuma alteração significativa. Por outro lado, animais diabéticos do grupo DCN apresentaram, mais uma vez, sinais histológicos condizentes com o aumento significativo dos níveis de ureia, refletindo complicações renais inerentes ao quadro diabetogênico instalado e descontrolado (Figura 15, página 162). Nesse grupo, foram observadas dilatações significativas nos túbulos proximais e distais, além de um processo inflamatório glomerular (Figura 16, página 163).

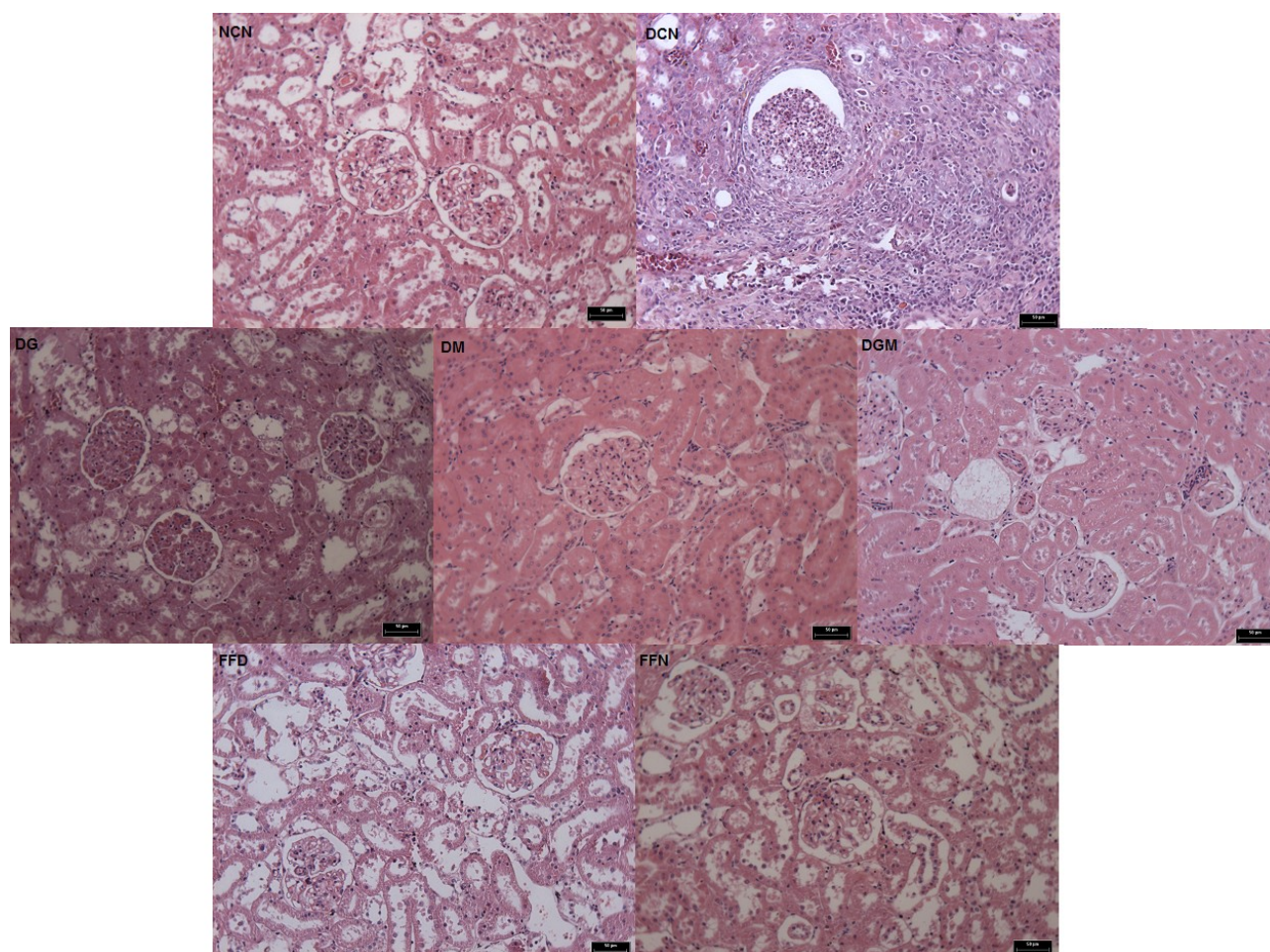


Figura 15: Fotomicrografias histológicas do córtex renal (H&E 200). NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg).

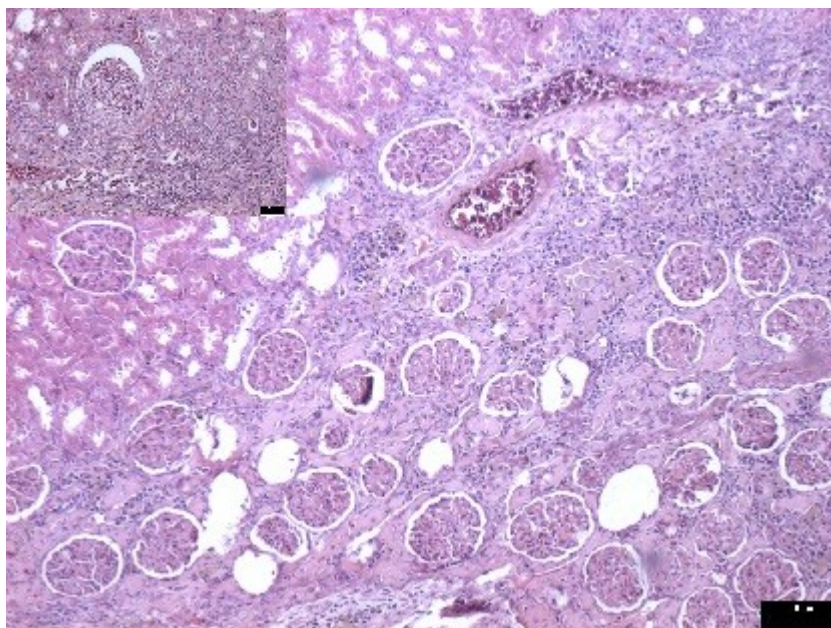


Figura 16: Fotomicrografias histológicas do córtex renal (H&E 200x, em destaque 400X), processo de glomerulonefrite no animais do grupo DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo).

A análise de parâmetros hematológicos foi mais uma ferramenta na avaliação de toxicidade causada pelo tratamento com FF em ratos diabéticos e normais. Como já havia sido observado para EAE, os animais que foram tratados com FF não apresentaram nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos avaliados (Tabela 16, página 164). Os demais grupos testados também não apresentaram alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 16: Parâmetros hematológicos de ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	Hb ^a (g/dL)	Htm ^a (x 10 ⁶ / uL)	VCM ^a (fL)	HCM ^a (pg)	CHCM ^a (g/dL)	Hct ^a (%)
DCN ^b	11,77 ± 0,36	6,30 ± 0,43	82,39 ± 5,50	19,39 ± 1,32	23,85 ± 1,40	50,40 ± 2,50
DG ^c	13,34 ± 0,63	5,67 ± 0,06*	71,58 ± 6,06*	23,57 ± 1,26	33,56 ± 1,58*	40,50 ± 3,34
DM ^d	13,03 ± 0,50	6,26 ± 0,07	71,70 ± 6,29*	20,79 ± 0,68	30,26 ± 3,10*	44,83 ± 3,94*
DGM ^e	16,03 ± 0,06	7,11 ± 0,02	70,35 ± 1,39	22,54 ± 0,06	32,15 ± 0,59	50,00 ± 0,87
FFD ^f	15,76 ± 0,18	7,28 ± 0,43	66,72 ± 5,49	22,39 ± 1,23	34,35 ± 1,16	46,50 ± 1,29
NCN ^g	16,14 ± 0,07	6,88 ± 0,13	65,33 ± 4,45	23,56 ± 0,51	37,14 ± 1,85	44,50 ± 2,36
FFN ^h	16,10 ± 0,03	6,99 ± 0,13	58,74 ± 2,86	23,13 ± 0,48	39,96 ± 1,50	40,80 ± 1,55
	LT ^a (x 10 ³ / uL)	Ba ^a (%)	Eo ^a (%)	Mo ^a (%)	Li ^a (%)	Ne ^a (%)
DCN ^a	6516,67 ± 128,24*	1,00 ± 0,01	2,33 ± 0,42	11,00 ± 1,24	31,33 ± 1,82	54,17 ± 1,77*
DG ^b	5075,00 ± 693,51	1,17 ± 0,17	3,33 ± 1,02	11,17 ± 1,91	34,33 ± 1,56	48,34 ± 2,48
DM ^c	6616,67 ± 590,57*	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,26	7,17 ± 0,91	31,17 ± 3,60	57,99 ± 3,84*
DGM ^d	4120,00 ± 474,66	1,00 ± 0,01	2,83 ± 0,65	13,00 ± 1,46	39,17 ± 2,10	44,00 ± 2,81
FFD ^e	3535,00 ± 428,83*	1,00 ± 0,01	4,00 ± 1,27	6,67 ± 1,69	28,33 ± 1,28	60,00 ± 1,80
NCN ^f	4330,00 ± 356,38	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,26	7,33 ± 1,33	38,83 ± 0,75	51,17 ± 2,11
FFN ^g	2765,00 ± 330,49*	1,00 ± 0,01	2,00 ± 0,01	7,50 ± 1,03	38,17 ± 1,01	51,33 ± 1,20

^a Hb, Concentração de hemoglobina; Htm, número de células (hematimetria); índices hematimétricos (VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração média da hemoglobina corpuscular); Hct, volume de células (hematócrito); LT, leucometria total; leucometria específica (tipos celulares: Ba, basófilo; Eo, eosinófilo; Mo, monócito; Li, linfócito; Ne, neutrófilo). ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); ^f FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa (p<0,01) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Os resultados apresentados na Tabela 16 (página 164) mostraram que FF possui significativa atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos, ao contrário do que foi observado para aqueles animais tratados com o hipoglicemiante oral glibenclamida. Essa atividade pode ser atribuída, em parte, à presença do ácido clorogênico, orientina e isoorientina nesse extrato, conforme discutido anteriormente.

Além disso, os resultados da avaliação hematológica e bioquímica revelaram que tanto EAE quanto FF contendo EAE não apresentaram nenhum tipo de toxicidade durante o período avaliado (6 meses), o que garante sua biossegurança.

5.3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Atividade antioxidante significativa foi encontrada em métodos *in vitro* e *in vivo* de EAE, o que indica que tal 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. Destaca-se aqui o fato de que o potencial antioxidante de EAE foi comparável às substâncias de referência testadas.

Diante disso foi avaliada a atividade antioxidante nos animais tratados com FF. Da mesma forma que havia sido dosado para EAE, analisou-se tanto as enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GSH, quanto um dos produtos da peroxidação lipídica, o MDA. As enzimas foram dosadas em homogenatos de fígado. Já os níveis de MDA foram dosados em homogenatos de fígado, cérebro e hemácias, células com membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados que são extremamente susceptíveis à formação de hidroperóxidos, como mencionado anteriormente.

Como pode ser observado na Tabela 17 (página 167), animais diabéticos dos grupos DCN, DG e DM, mais uma vez, apresentaram elevados níveis de MDA em todos os tecidos analisados, além de redução na atividade enzimática de SOD, CAT e GSH, caracterizando um quadro de elevado estresse oxidativo. Semelhante ao que já havia sido observado para EAE, animais diabéticos tratados com FF não apresentaram esse quadro característico, mantendo níveis reduzidos de MDA nos 3 tecidos e níveis significativamente semelhantes ao controle normal na atividade enzimática de SOD, CAT e GSH.

Tabela 17: Níveis de malonaldeído e enzimas antioxidantes, catalase, superóxido dismutase e glutatona reduzida, em ratos diabéticos e normais após tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	MDA (nM/mL) ^a			CAT ^a (U/mL)	SOD ^a (U/mL)	GSH ^a (U/mL)
	Fígado	Cérebro	Hemácia			
DCN^b	12,18 ± 0,75*	12,77 ± 0,39*	51,70 ± 1,01*	0,28 ± 0,06*	0,57 ± 0,20*	0,68 ± 0,21*
DG^c	9,40 ± 1,73*	11,69 ± 0,54*	40,03 ± 4,87*	0,73 ± 0,23*	1,25 ± 0,36*	0,65 ± 0,13*
DM^d	7,64 ± 1,95	17,85 ± 3,65*	31,67 ± 4,98*	2,05 ± 0,46	1,97 ± 0,59*	0,56 ± 0,04*
DGM^e	0,83 ± 0,27	0,95 ± 0,53	5,59 ± 0,83	3,89 ± 0,48	11,20 ± 0,80	9,67 ± 0,78
FFD^f	1,96 ± 0,71	1,43 ± 0,59	4,93 ± 0,79	6,14 ± 0,32	11,97 ± 0,50	7,07 ± 0,25
NCN^g	1,84 ± 1,18	2,18 ± 0,80	5,84 ± 1,18	4,54 ± 0,66	12,39 ± 1,30	9,07 ± 1,84
FFN^h	1,86 ± 0,63	1,37 ± 0,37	4,83 ± 1,01	6,05 ± 0,89	12,07 ± 0,40	9,06 ± 0,90

^a MDA, malonaldeído; CAT, catalase; SOD, superóxido desmutase; GSH, glutatona redutase. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DG, animais diabéticos tratados com glibenclamida (3 mg/kg); ^d DM, animais diabéticos tratados com metformina (120 mg/kg); ^e DGM, animais diabéticos tratados com glimepirida (2 mg/kg); ^f FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^g NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^h FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa (p<0,01) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Alguns estudos demonstram o efeito que o diabetes melito experimental determina no tecido hepático em relação às espécies reativas de oxigênio (BAYNES, 1991; GOLDIN et al., 1997; MOHAN e DAS, 1998; KENSLER, WAKABAYASHI, BIWAL, 2007). Goldin e colaboradores (1997) demonstraram que houve um aumento na lipoperoxidação em animais diabéticos induzidos por estreptozocina, o qual foi determinado pelo aumento de MDA plasmático.

Nesse trabalho, quando foi avaliada a atividade antioxidante no fígado de animais diabéticos não tratados, notou-se uma redução significativa na atividade de todas as enzimas antioxidantes analisadas, como já mencionado. Isso coincidiu com o aumento significativo na peroxidação lipídica, evidenciado pelo elevado nível de MDA em todos os tecidos.

Estudos demonstram que a redução das enzimas antioxidantes no DM experimental são mais pronunciadas no cérebro e no fígado desses animais, onde a glutathione transferase está diretamente envolvida (CAMERON et al., 1986). O papel fisiológico da glutathione transferase no início da detoxificação de potenciais agentes alcalinizantes, como a estreptozocina, parece ser o mecanismo de ação diretamente relacionado (HERMENEGILDO et al., 1993; PICKUP e WILLIAMS, 1997). De acordo com esses autores, a glutathione transferase apresenta em sua estrutura um radical sulfidril, que utiliza como substrato a glutathione reduzida (GSH). Dessa forma, o processo de detoxificação gerado durante a indução pela STZ levaria a uma redução significativa do substrato GSH diante do aumento na demanda de glutathione peroxidase. Como efeito cascata, reduziriam, então, os níveis de SOD e CAT, por mecanismos relacionados e explicados anteriormente.

Uma vez que os animais que foram induzidos com STZ e tratados com FF não apresentaram esse quadro de alterações enzimáticas, pode-se concluir que a atividade antioxidante significativa de EAE (já discutida anteriormente) evitou os danos causados por essa substância alcalinizante, a STZ. Isso pode ser explicado pela ação antioxidante direta do próprio extrato, que entra como um sistema complementar que antecede a essa detoxificação dependente da glutathione transferase. Dessa forma, ao poupar essa enzima, não são esgotados os substratos GSH, nem tão pouco SOD e CAT, refletindo em níveis normais de MDA.

5.3.4 EFEITO DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA APÓS INTERRUPTÃO DO TRATAMENTO EM ANIMAIS DIABÉTICOS E NORMAIS

Após os 6 meses de avaliação, parte dos animais foi mantida viva, porém sem receber qualquer tipo de tratamento, a fim de se avaliar a extensão dos efeitos hipoglicemiante e antioxidante de FF. Os animais foram mantidos por mais 6 meses sem nenhum tipo de tratamento adicional, sendo monitorados apenas a glicemia, a massa corporal e os consumos semanais de ração e água.

O Gráfico 11 (página 170) mostra a variação das glicemias ao longo dos 6 meses de observação após a interrupção do tratamento. A evolução glicêmica dos animais diabéticos e normais, de maneira semelhante ao que já havia sido realizado para FF logo após os 6 de tratamento, foi expressa em um gráfico de área sob a curva. Sendo assim, elevados valores de glicemia apresentaram áreas em torno de 3000, conforme observado nos grupos DCN.

Como é possível avaliar no Gráfico 11 (página 170), mesmo após ser interrompido o tratamento com FF, os animais diabéticos mantiveram glicemias próximas aos parâmetros normais. Isso reflete, claramente, que EAE foi capaz de reverter os danos causados sobre as células pancreáticas pela indução com STZ. Esses resultados podem, em parte, ser explicados pela hiperplasia das ilhotas em animais tratados tanto com EAE quanto com FF, visualizada logo após o tratamento de 6 meses. A hiperplasia parece ser um quadro permanente, uma vez que mesmo após a interrupção do tratamento com FF animais diabéticos mantiveram o nível de insulina elevado e estatisticamente igual aos animais normais (Tabela 18, página 172).

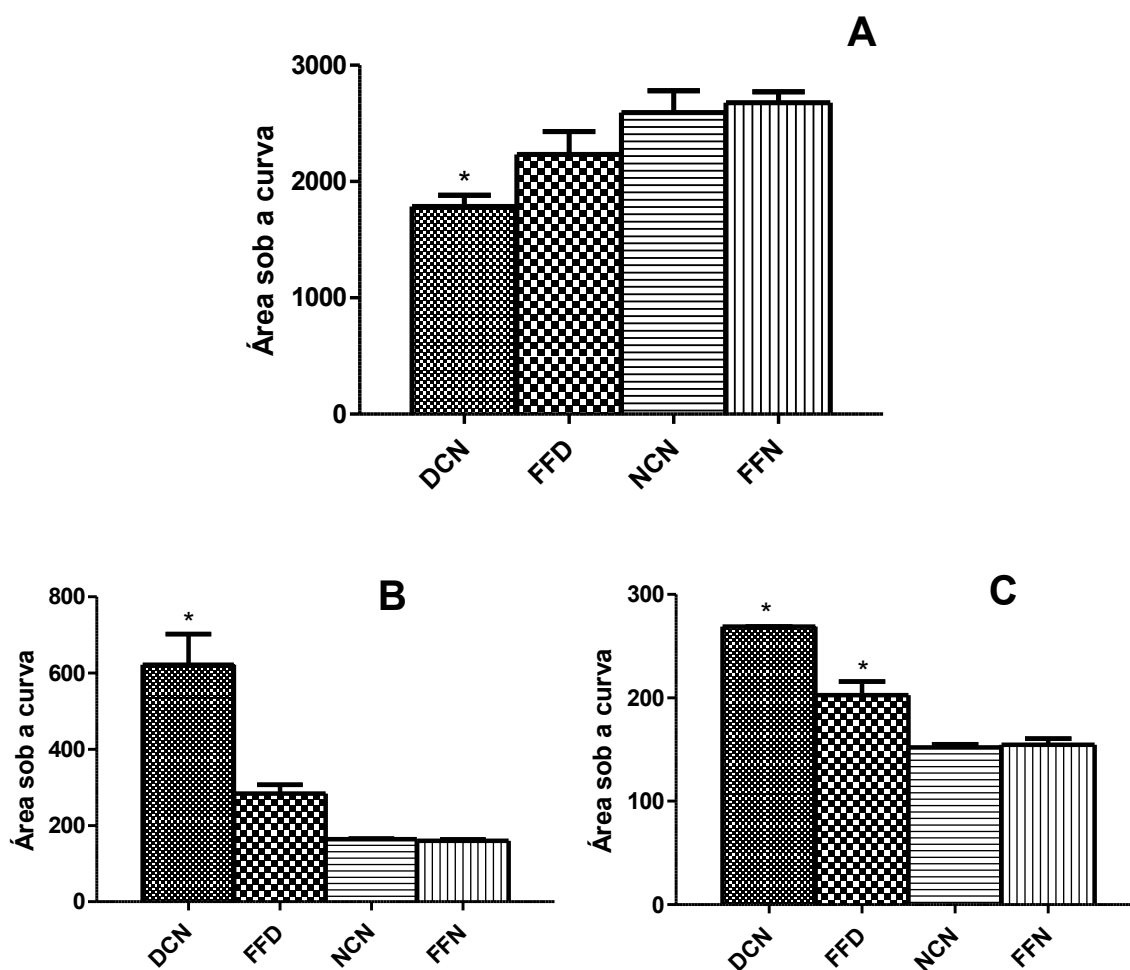


Gráfico 11: **A** Área sob a curva dos níveis de glicemia em ratos diabéticos e normais após interrupção do tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* Trécul e controle negativo (tempo 0), e após 1, 3 e 6 meses de tratamento (tempos 1, 3 e 6). **B** Níveis glicêmicos em ratos diabéticos e normais após interrupção do tratamento (tempo 0) e após 1, 3 e 6 meses de tratamento (tempos 1, 3 e 6) com a formulação farmacêutica oral de *Cecropia pachystachya* Trécul e controle negativo. DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) da glicemia quando comparada ao grupo DCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

A estabilidade glicêmica é confirmada, ainda pelos baixos níveis de hemoglobina glicada e frutossamina observados nos animais que foram tratados previamente com FF (Tabela 18, página 172). Por outro lado, animais diabéticos do grupo DCN mantiveram o quadro de elevação desses dois parâmetros, indicando que os efeitos deletérios produzidos pela STZ foram irreversíveis. Os níveis reduzidos de insulina nesse grupo DCN confirmam essa hipótese de ação deletéria irreversível da STZ sobre as ilhotas pancreáticas, justificando a instabilidade glicêmica observada.

Tabela 18: Avaliação de parâmetros bioquímicos em ratos após interrupção de tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controle negativo

Parâmetros ^a	DCN ^b	DFF ^c	NCN ^d	FFN ^e
Insulina (µg/mL)	3,75 ± 0,31*	10,66 ± 0,39	10,37 ± 0,37	10,49 ± 0,70
HbA1c (% total Hb)^a	14,70 ± 0,34*	2,57 ± 0,16	1,90 ± 0,13	2,00 ± 0,17
Frutosamina (mM/L)	4,13 ± 0,14*	1,10 ± 0,11	1,23 ± 0,09	1,35 ± 0,10
Glicogênio hepático (µM/L)	83,76 ± 4,12*	185,94 ± 18,33	196,42 ± 7,49	182,84 ± 1,26
Glicogênio muscular (µM/L)	87,85 ± 9,36*	129,15 ± 4,40	129,64 ± 8,27	115,85 ± 5,66
Lactato (mg/dL)	112,01 ± 3,82*	16,71 ± 0,32	19,14 ± 0,54	18,04 ± 0,21
CT^a	162,72 ± 9,73*	93,43 ± 3,77	85,94 ± 0,61	103,35 ± 0,11
LDL^a	97,24 ± 8,24*	27,78 ± 1,29	26,24 ± 0,90	23,14 ± 0,07
VLDL^a	48,22 ± 0,68*	15,62 ± 0,87	15,14 ± 0,49	14,33 ± 0,17
HDL^a	17,27 ± 3,25*	50,03 ± 2,56	44,56 ± 0,94	65,88 ± 0,10*
TG^a	241,09 ± 3,40*	78,09 ± 4,35	75,68 ± 2,44	71,65 ± 0,85
ALT^a (U/mL)	134,65 ± 3,96*	36,09 ± 5,22	36,90 ± 4,20	33,75 ± 0,88
AST^a (U/mL)	131,45 ± 1,36*	31,00 ± 5,12	31,70 ± 9,46	31,30 ± 5,37
GGT^a (U/mL)	4,87 ± 1,13*	1,72 ± 0,19	1,33 ± 1,18	1,48 ± 0,27
ALP^a (U/L)	74,09 ± 0,89*	41,64 ± 2,51	54,03 ± 1,96	37,40 ± 2,67
BT^a (mg/dL)	1,07 ± 0,18	1,11 ± 0,16	1,44 ± 0,27	0,92 ± 0,04
BI^a (mg/dL)	0,67 ± 0,16*	0,57 ± 0,24*	0,93 ± 0,18	0,77 ± 0,05
BD^a (mg/dL)	0,40 ± 0,09	0,54 ± 0,10	0,51 ± 0,12	0,15 ± 0,01
Proteína total (g/L)	7,06 ± 0,09	7,07 ± 0,19	7,06 ± 0,19	6,09 ± 0,13
Albumina (g/L)	5,11 ± 0,28	5,71 ± 0,19	5,99 ± 0,36	4,99 ± 0,99
Globulina (g/L)	1,95 ± 0,29	1,36 ± 0,17	1,27 ± 0,22	1,10 ± 0,29
Ureia (mg/dL)	50,85 ± 5,79*	25,00 ± 3,21	21,83 ± 4,07	37,33 ± 7,36
Creatinina (mg/dL)	1,21 ± 0,49*	0,48 ± 0,05	0,57 ± 0,12	0,40 ± 0,02

^a Parâmetros bioquímicos, HbA1c, Hemoglobina glicada; CT, colesterol total; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, γ -glutamil-transferase; ALP, fosfatase alcalina; BT, bilirrubina total; BI, bilirrubina indireta; BD, bilirrubina direta. ^b

DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ° FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ° NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ° FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa ($p < 0,01$) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Todos os parâmetros analisados anteriormente para EAE e FF foram reavaliados nesses animais, incluindo dentre as dosagens bioquímicas os níveis de lactato, que ainda não havia sido dosado em estudos anteriores. O lactato é o produto final de degradação da glicose na ausência de oxigênio, durante a glicólise anaeróbia, sendo produzido na redução de piruvato. A concentração de lactato no sangue é dependente da taxa de sua produção que ocorre, principalmente, no cérebro, músculo esquelético e hemácias. Além disso, a concentração de lactato depende da taxa de metabolismo hepático e renal. Aproximadamente 30% da produção basal total de lactato são utilizados pelo fígado com predominância na gliconeogênese (TIETZ, 1994).

A concentração elevada de lactato no sangue indica um decréscimo do fluxo sanguíneo para os tecidos, com conseqüente redução do fornecimento de oxigênio. Isso pode ocorrer em eventos de hipovolemia, choque, insuficiência ventricular esquerda ou acidose láctica. Essa última, geralmente está associada a doenças como diabetes melito, neoplasia e doença hepática (TIETZ, 1994).

Dessa forma, a análise de lactato (método enzimático, Trinder - LABTEST) nesse trabalho, teve como objetivos avaliar tanto a estabilidade glicêmica quanto a ausência de toxicidade a longo prazo. Como podemos observar, animais que receberam FF antes da interrupção do tratamento mantiveram níveis estatisticamente normais de lactato, enquanto aqueles do grupo DCN tiveram um aumento significativo. O aumento de lactato nesse grupo DCN é reflexo da instabilidade glicêmica, que culmina em uma reduzida concentração das reservas de glicogênios hepático e muscular. Nesses animais, a ausência de insulina desencadeia um processo gliconeogênico intenso e constante, culminando na elevação dos níveis de lactato. Além disso, como a dosagem de lactato constitui

uma medida indireta de avaliação de dano hepático, elevações desse parâmetro ratificam alterações observadas em todo o perfil de enzimas hepáticas nesse grupo (Tabela 18, página 172).

O Gráfico 12 (página 175) mostra a evolução da massa corporal e dos consumos de ração e água após a interrupção do tratamento com FF em animais diabéticos e normais. Como pode ser observado, os animais diabéticos mantiveram padrões estatisticamente semelhantes aos animais normais, mostrando seu perfeito estado de homeostase glicêmica. Já os animais do grupo DCN, continuaram apresentando redução da massa corporal e elevação no consumo de ração e água, refletindo a instabilidade glicêmica do grupo.

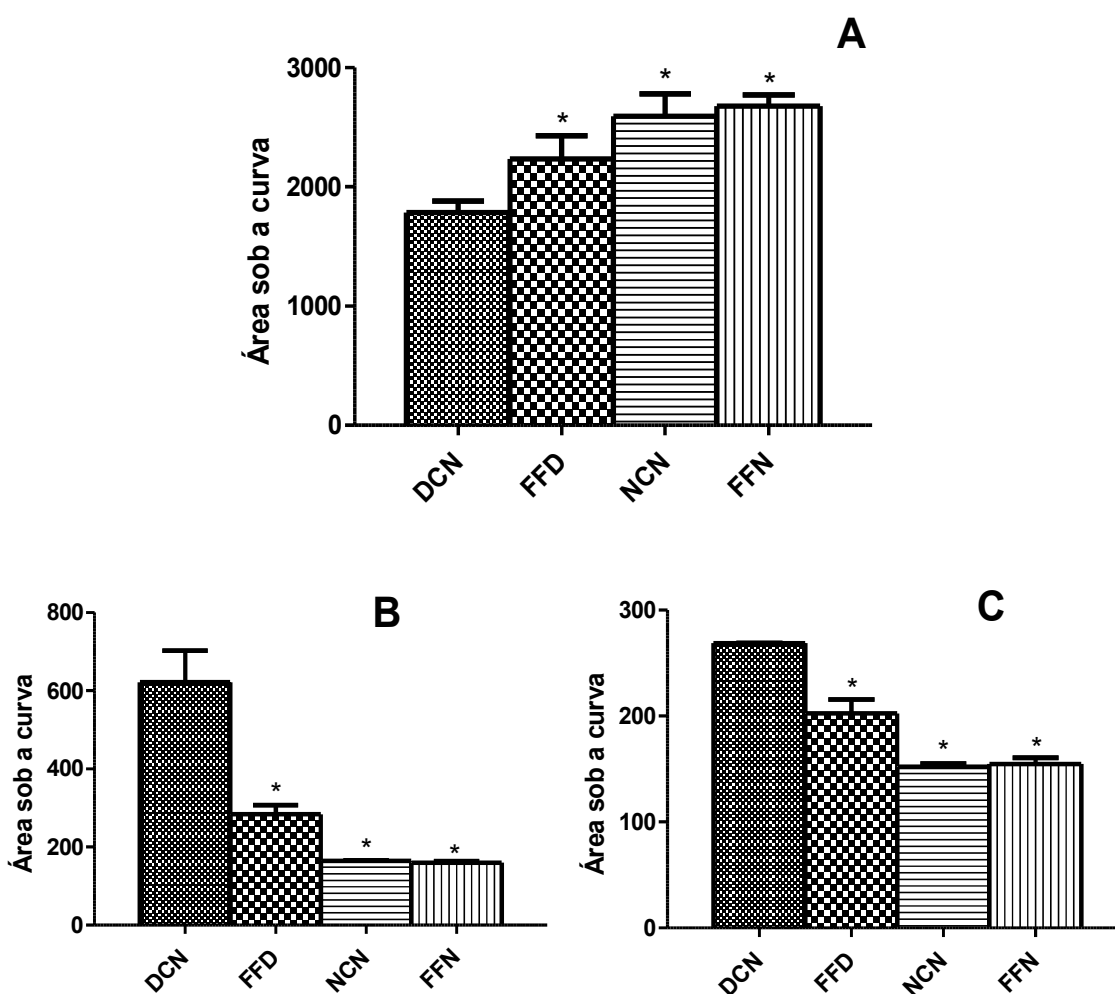


Gráfico 12: Área sob a curva de evolução da massa corporal (**A**), consumo de ração (**B**) e consumo de água (**C**) em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina e normais após interrupção do tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos. DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Parâmetros hematológicos foram também avaliados a fim de se verificar sinais de toxicidade gerados a longo prazo, mesmo após a interrupção do tratamento com FF. De um modo geral, como pode ser observado na Tabela 19 (página 176), não houve alterações significativas de nenhum parâmetro hematológico em todos os grupos, exceto pela redução significativa no número de leucócitos totais dos animais do grupo FFD.

Tabela 19: Avaliação de parâmetros hematológicos em ratos após interrupção de tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controle negativo

Parâmetros ^a	DCN ^b	DFF ^c	NCN ^d	FFN ^e
Hb ^a (g/dL)	12,31 ± 0,53	16,02 ± 0,03	16,16 ± 0,03	15,95 ± 0,02
Htm ^a (x 10 ⁶ / uL)	5,00 ± 0,06	5,98 ± 0,02	7,17 ± 0,14	7,08 ± 0,01
VCM ^a (fL)	98,82 ± 0,47	48,45 ± 3,70	70,29 ± 1,61	52,21 ± 2,30
HCM ^a (pg)	24,65 ± 1,14	22,94 ± 0,06	22,54 ± 0,05	22,51 ± 0,10
CHCM ^a (g/dL)	25,07 ± 1,35	49,68 ± 3,42	32,22 ± 0,74	43,88 ± 1,93
Hct ^a (%)	39,40 ± 0,83*	43,90 ± 2,70	50,40 ± 1,19	47,00 ± 1,67
LT ^a (x 10 ³ / uL)	3760,00 ± 28,66	2915,00 ± 14,04	3000,00 ± 16,67	2525,00 ± 14,67
Ba ^a (%)	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02
Eo ^a (%)	1,00 ± 0,01	1,60 ± 0,16	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02
Mo ^a (%)	12,80 ± 1,31	8,00 ± 1,03	14,40 ± 1,36	25,25 ± 0,42
Li ^a (%)	33,60 ± 1,07	36,40 ± 1,83	37,40 ± 2,06	38,00 ± 0,67
Ne ^a (%)	47,80 ± 1,27	53,00 ± 2,71	45,00 ± 2,90	46,00 ± 2,10

^a Hb, Concentração de hemoglobina; Htm, número de células (hematimetria); índices hematimétricos (VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração média da hemoglobina corpuscular); Hct, volume de células (hematócrito); LT, leucometria total; leucometria específica (tipos celulares: Ba, basófilo; Eo, eosinófilo; Mo, monócito; Li, linfócito; Ne, neutrófilo). ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c DFF, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^d NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^e FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Por fim, o perfil antioxidante foi analisado no fígado, cérebro e hemácias dos animais diabéticos e normais que foram tratados com FF e tinham o tratamento interrompido há 6 meses. O objetivo foi avaliar a reversão total do estresse oxidativo gerado pela indução com STZ. A Tabela 20 (página 177) mostra que, mesmo após ser interrompido o tratamento com FF os animais diabéticos mantiveram níveis estatisticamente iguais aos parâmetros normais. Os animais do grupo DCN, por outro lado, permaneceram com o quadro típico do estresse oxidativo, com elevadas concentrações de MDA em todos os órgãos e reduzidas atividades enzimáticas de SOD, CAT e GSH.

Tabela 20: Níveis de malonaldeído e enzimas antioxidantes, catalase, superóxido desmutase e glutatona reduzida, em ratos diabéticos e normais após interrupção do tratamento com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* e controles negativo e positivos

Grupos	MDA (nM/mL) ^a			CAT ^a (U/mL)	SOD ^a (U/mL)	GSH ^a (U/mL)
	Fígado	Cérebro	Hemácia			
DCN^b	18,12 ± 0,68*	16,59 ± 1,58*	48,57 ± 1,32*	0,12 ± 0,09*	0,78 ± 0,08*	0,88 ± 0,09*
FFD^c	7,98 ± 0,08	5,19 ± 0,07	5,44 ± 0,89	5,64 ± 0,15	12,09 ± 0,18	10,09 ± 0,23
NCN^d	4,52 ± 0,81	3,96 ± 0,30	4,99 ± 0,86	5,55 ± 0,25	12,87 ± 0,27	9,89 ± 0,19
FFN^e	7,63 ± 0,28	5,46 ± 0,21	5,08 ± 0,96	5,04 ± 0,30	11,99 ± 0,18	10,06 ± 0,47

^a MDA, malonaldeído; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; GSH, glutatona redutase. ^b DCN, animais diabéticos controle negativo (induzidos com estreptozotocina e tratados apenas com veículo); ^c FFD, animais diabéticos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg); ^d NCN, animais normais controle negativo (recebem apenas tampão citrato na indução e tratados com veículo); ^e FFN, animais normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* (20 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. * representa diferença significativa (p<0,01) do parâmetro dosado quando comparado ao grupo NCN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

5.4 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DE *Cecropia pachystachya* EM RATOS DIABÉTICOS E NORMAIS

A capacidade de proteção das células pancreáticas pela formulação farmacêutica foi também avaliada. Para isso, os animais foram previamente tratados por 14 dias com FF e, depois, submetidos à indução com estreptozocina. Foram também utilizados controles negativos tanto do tratamento quanto da indução.

A análise das glicemias de jejum dos animais tratados com FF previamente à indução mostrou uma redução significativa desses parâmetros já na confirmação do quadro diabetogênico. No grupo de animais diabéticos tratados com FF foi possível observar uma média de glicemia de jejum em torno de 170 mg/dL, contra uma média de 430 mg/dL do grupo de animais diabéticos do controle negativo (Gráfico 13, página 178).

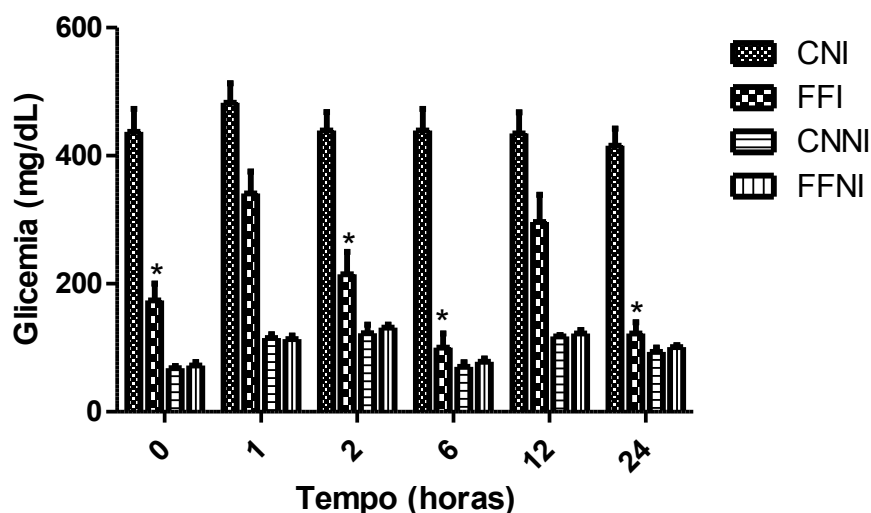


Gráfico 13: Efeito do tratamento prévio com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* na indução ao diabetes melito utilizando estreptozotocina. CNI = animais controle negativo induzidos, que corresponde ao grupo de animais que durante o tratamento prévio receberam apenas veículo e foram induzidos com estreptozocina; FFI = animais tratados com a formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila, que corresponde ao grupo de animais que durante o tratamento prévio receberam formulação farmacêutica e foram induzidos com estreptozocina; CNNI = animais controle negativo não induzidos, que corresponde ao grupo de animais que durante o tratamento prévio receberam apenas o veículo e na indução receberam apenas tampão citrato; FFNI = animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila não induzidos, que corresponde ao grupo de animais que durante o tratamento prévio receberam formulação farmacêutica e na indução receberam apenas tampão citrato. *Redução significativa da glicemia de animais diabéticos em relação à glicemia do grupo CNI.

Os resultados mostraram que FF exerce um efeito protetor sob as ilhotas e, possivelmente, as células B pancreáticas, reduzindo os danos causados durante a indução com estreptozocina. Isso pode, em parte, ser explicado pela significativa atividade antioxidante apresentada por EAE. A capacidade sequestradora de elétrons, demonstrada por resultados *in vitro* de EAE, além da ação direta sob a atividade enzimática de SOD, CAT e GSH no fígado de animais tratados com FF atuam neutralizando os radicais livres gerados pela ação diabetogênica de STZ, exercendo se efeito protetor sob as ilhotas pancreáticas.

5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA EM RATOS MACHOS E FÊMEAS

A fim de se avaliar a amplitude terapêutica da formulação farmacêutica, ratos machos e fêmeas receberam doses únicas que variaram de 200 a 2000 mg/kg. Foram analisados parâmetros bioquímicos e hematológicos, além da evolução da massa corporal e consumos de ração e água.

As concentrações testadas não foram suficientes para causar alterações fatais em machos e fêmea (DL > 2000 mg/kg). Em todas as concentrações testadas não foi observada nenhuma alteração significativa dos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados, tanto em machos (Tabelas 21 e 22, páginas 181 e 182, respectivamente, Gráfico 14, página 183) quanto em fêmeas (Tabelas 23 e 24, páginas 184 e 185, respectivamente, Gráfico 15, página 186).

Tabela 21: Avaliação de toxicidade aguda em ratos machos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila

Parâmetros ^a	CN ^b	FF (EAE 200 mg/kg) ^c	FF (EAE 600 mg/kg) ^d	FF (EAE 1000 mg/kg) ^e	FF (EAE 2000 mg/kg) ^f
AST (U/L) ^a	26,94 ± 0,30	27,90 ± 0,80	25,84 ± 0,29	26,97 ± 0,70	28,59 ± 0,77
ALT (U/L) ^a	29,84 ± 0,25	22,03 ± 0,69	27,00 ± 0,92	25,99 ± 0,23	25,86 ± 0,66
GGT (U/L) ^a	8,67 ± 1,33	11,05 ± 2,32	9,62 ± 1,00	9,49 ± 2,21	8,87 ± 2,70
ALP (U/L) ^a	57,29 ± 2,63	59,44 ± 1,54	51,15 ± 2,33	56,29 ± 2,93	52,26 ± 3,15
BT (mg/dL) ^a	1,05 ± 0,02	1,01 ± 0,02	1,07 ± 0,04	1,06 ± 0,05	1,05 ± 0,05
BD (mg/dL) ^a	0,50 ± 0,03	0,53 ± 0,07	0,44 ± 0,04	0,50 ± 0,06	0,55 ± 0,02
BI (mg/dL) ^a	0,55 ± 0,02	0,58 ± 0,06	0,63 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,50 ± 0,04
PT (mg/dL) ^a	5,25 ± 0,20	5,12 ± 0,41	5,34 ± 0,15	5,64 ± 0,23	5,15 ± 0,24
Ab (mg/dL) ^a	3,13 ± 0,35	3,16 ± 0,51	3,21 ± 0,23	3,25 ± 0,16	3,00 ± 0,11
Gb (mg/dL) ^a	2,12 ± 0,25	1,96 ± 0,46	2,13 ± 0,17	2,39 ± 0,20	2,15 ± 0,15
Ur (mg/dL) ^a	38,59 ± 2,50	43,30 ± 2,01	42,84 ± 3,66	43,48 ± 2,35	41,39 ± 2,53
Crt (mg/dL) ^a	0,86 ± 0,20	0,85 ± 0,11	0,79 ± 0,09	0,82 ± 0,10	0,88 ± 0,16
CT (mg/dL) ^a	101,03 ± 3,78	104,98 ± 1,09	99,94 ± 0,32	101,11 ± 2,11	105,15 ± 3,51
HDL (mg/dL) ^a	57,35 ± 2,68	58,67 ± 1,25	61,59 ± 1,29	59,24 ± 1,08	60,07 ± 2,44
VLDL (mg/dL) ^a	14,47 ± 0,89	13,82 ± 1,08	13,51 ± 0,94	14,32 ± 0,98	14,02 ± 1,13
LDL (mg/dL) ^a	29,21 ± 3,56	32,49 ± 1,67	24,84 ± 1,32	27,55 ± 1,46	31,06 ± 1,61
TG (mg/dL) ^a	72,35 ± 2,68	69,11 ± 2,09	67,54 ± 1,27	71,62 ± 2,82	70,10 ± 3,55
Fr (nM/L) ^a	1,89 ± 0,08	1,76 ± 0,16	1,74 ± 0,09	1,93 ± 0,89	1,82 ± 0,12
Lc (mg/dL) ^a	20,02 ± 1,07	18,48 ± 2,35	19,36 ± 2,03	20,71 ± 3,56	21,57 ± 1,87
LDH (U/L) ^a	412,03 ± 10,58	405,56 ± 13,02	395,46 ± 28,39	400,09 ± 18,32	390,99 ± 21,00

^a Parâmetros bioquímicos, AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, γ -glutamil transferase, ALP, fosfatase alcalina; BT, bilirrubina total; BD, bilirrubina direta; BI, bilirrubina indireta; PT, proteínas totais; Ab, albumina; Gb, globulina; Ur, ureia; Crt, creatinina; CT, colesterol total; HDL, lipoproteína de alta densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicerídeos; Fr, frutossamina; Lc, lactato; LDH, lactato desidrogenase. ^b CN, controle negativo; ^c FF (EAE 200 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 200 mg/kg; ^d FF (EAE 600 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 600 mg/kg; ^e FF (EAE 1000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 1000 mg/kg; ^f FF (EAE 2000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 2000 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo CN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Tabela 22: Avaliação de parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade aguda em ratos machos tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila

Parâmetros ^a	CN ^b	FF (EAE 200 mg/kg) ^c	FF (EAE 600 mg/kg) ^d	FF (EAE 1000 mg/kg) ^e	FF (EAE 2000 mg/kg) ^f
Hb^a (g/dL)	15,34 ± 0,25	15,48 ± 0,18	15,25 ± 0,10	15,78 ± 0,20	15,63 ± 0,33
Htm^a (x 10⁶/ uL)	7,51 ± 0,01	6,99 ± 0,05	7,09 ± 0,02	7,40 ± 0,01	7,50 ± 0,02
VCM^a (fL)	53,59 ± 0,94	58,44 ± 0,99	59,35 ± 1,01	59,45 ± 1,06	54,21 ± 0,97
HCM^a(pg)	20,43 ± 0,23	22,15 ± 0,54	21,51 ± 0,70	21,32 ± 0,29	20,84 ± 0,48
CHCM^a (g/dL)	38,12 ± 0,29	37,87 ± 0,99	36,24 ± 0,50	35,87 ± 0,33	38,44 ± 0,61
Hct^a (%)	40,25 ± 0,57	40,88 ± 0,66	42,08 ± 0,27	43,99 ± 0,29	40,66 ± 0,77
LT^a (x 10³/ uL)	3195,00 ± 164,06	3000,00 ± 120,42	3405,00 ± 331,45	3065,00 ± 357,46	3272,22 ± 245,53
Ba^a (%)	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,01
Eo^a (%)	1,30 ± 0,15	1,30 ± 0,15	1,30 ± 0,21	1,70 ± 0,30	1,67 ± 0,29
Mo^a (%)	8,00 ± 1,16	7,60 ± 1,26	8,60 ± 1,12	9,50 ± 1,17	9,78 ± 1,65
Li^a (%)	41,60 ± 1,63	39,60 ± 2,61	43,20 ± 2,27	35,50 ± 2,77	35,78 ± 2,28
Ne^a (%)	47,10 ± 1,94	49,90 ± 2,35	46,30 ± 2,41	53,30 ± 1,81	51,78 ± 3,27

^a Hb, Concentração de hemoglobina; Htm, número de células (hematimetria); índices hematimétricos (VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração média da hemoglobina corpuscular); Htc, volume de células (hematócrito); LT, leucometria total; leucometria específica (tipos celulares: Ba, basófilo; Eo, eosinófilo; Mo, monócito; Li, linfócito; Ne, neutrófilo). ^b CN, controle negativo; ^c FF (EAE 200 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 200 mg/kg; ^d FF (EAE 600 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 600 mg/kg; ^e FF (EAE 1000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 1000 mg/kg; ^f FF (EAE 2000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 2000 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo CN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

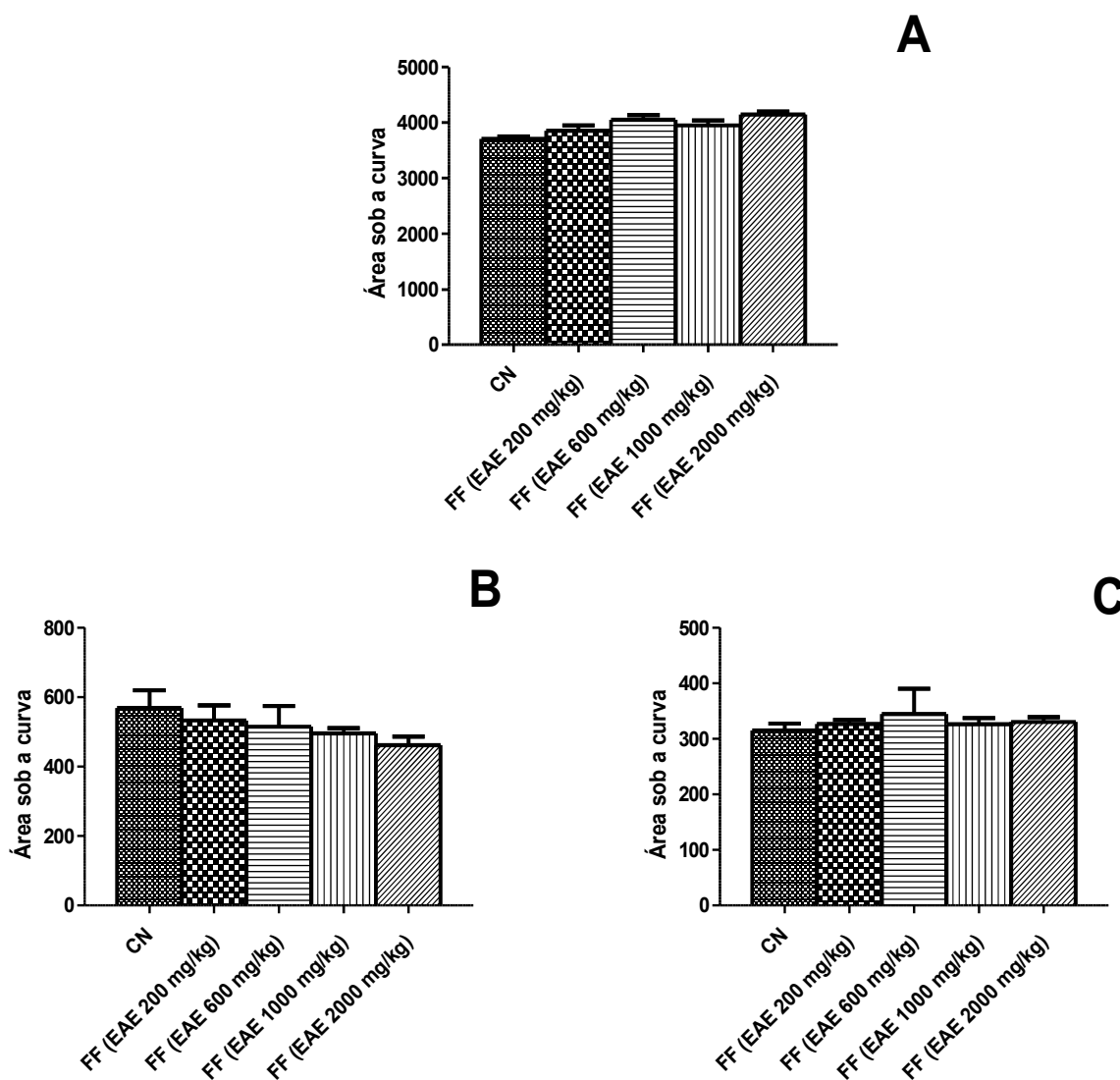


Gráfico 14: Área sob a curva de evolução da massa corporal (**A**), consumo de ração (**B**) e consumo de água (**C**) em ratos machos normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* em diferentes concentrações. Estudo de toxicidade aguda em machos. CN, controle negativo; FF (EAE 200 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 200 mg/kg; FF (EAE 600 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 600 mg/kg; FF (EAE 1000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 1000 mg/kg; FF (EAE 2000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 2000 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo CN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Tabela 23: Avaliação de parâmetros bioquímicos do estudo de toxicidade aguda em ratos fêmeas tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila

Parâmetros ^a	CN ^b	FF (EAE 200 mg/kg) ^c	FF (EAE 600 mg/kg) ^d	FF (EAE 1000 mg/kg) ^e	FF (EAE 2000 mg/kg) ^f
AST (U/L) ^a	28,94 ± 0,28	29,09 ± 0,70	28,47 ± 0,54	29,07 ± 0,50	29,95 ± 0,67
ALT (U/L) ^a	28,94 ± 0,27	29,03 ± 0,69	28,50 ± 0,55	29,09 ± 0,52	29,95 ± 0,76
GGT (U/L) ^a	8,67 ± 1,33	10,95 ± 3,62	6,42 ± 2,47	4,90 ± 1,21	4,87 ± 1,70
ALP (U/L) ^a	61,92 ± 3,36	49,64 ± 2,48	40,03 ± 0,07	36,29 ± 3,33	26,66 ± 1,20
BT (mg/dL) ^a	1,17 ± 0,03	1,21 ± 0,02	1,15 ± 2,33	1,06 ± 0,05	1,15 ± 0,05
BD (mg/dL) ^a	0,64 ± 0,08	0,63 ± 0,07	0,72 ± 0,04	0,70 ± 0,06	0,72 ± 0,02
BI (mg/dL) ^a	0,53 ± 0,07	0,58 ± 0,06	0,44 ± 0,04	0,36 ± 0,07	0,42 ± 0,04
PT (mg/dL) ^a	4,52 ± 0,20	4,12 ± 0,11	4,34 ± 0,15	4,64 ± 0,23	4,15 ± 0,19
Ab (mg/dL) ^a	3,47 ± 0,17	3,06 ± 0,15	3,11 ± 0,23	3,50 ± 0,16	3,01 ± 0,17
Gb (mg/dL) ^a	1,05 ± 0,19	1,06 ± 0,16	1,23 ± 0,17	1,13 ± 0,20	1,13 ± 0,15
Ur (mg/dL) ^a	42,65 ± 3,00	33,40 ± 3,31	72,84 ± 17,66	23,48 ± 3,95	31,94 ± 5,38
Crt (mg/dL) ^a	0,67 ± 0,22	0,50 ± 0,11	0,39 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,38 ± 0,16
CT (mg/dL) ^a	105,53 ± 4,44	94,18 ± 0,59	94,93 ± 0,26	110,77 ± 3,87	115,58 ± 5,19
HDL (mg/dL) ^a	59,21 ± 1,59	56,94 ± 2,35	59,53 ± 2,09	59,24 ± 1,08	60,70 ± 2,44
VLDL (mg/dL) ^a	13,07 ± 0,94	14,82 ± 1,82	11,47 ± 0,67	12,34 ± 0,56	14,35 ± 1,13
LDL (mg/dL) ^a	33,25 ± 5,16	22,42 ± 2,46	23,93 ± 2,30	39,18 ± 4,06	40,53 ± 6,11
TG (mg/dL) ^a	65,35 ± 4,68	74,11 ± 9,08	57,34 ± 3,37	61,72 ± 2,82	71,77 ± 5,63
Fr (nM/L) ^a	1,75 ± 0,09	1,65 ± 0,07	1,74 ± 0,14	2,03 ± 0,08	2,20 ± 0,09
Lc (mg/dL) ^a	18,52 ± 3,73	14,08 ± 3,55	13,26 ± 3,08	15,71 ± 3,60	15,87 ± 2,52
LDH (U/L) ^a	403,19 ± 15,78	354,49 ± 18,07	415,06 ± 30,29	380,12 ± 18,32	330,69 ± 31,68

^a Parâmetros bioquímicos, AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, γ -glutamil transferase, ALP, fosfatase alcalina; BT, bilirrubina total; BD, bilirrubina direta; BI, bilirrubina indireta; PT, proteínas totais; Ab, albumina; Gb, globulina; Ur, ureia; Crt, creatinina; CT, colesterol total; HDL, lipoproteína de alta densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; TG, triglicerídeos; Fr, frutossamina; Lc, lactato; LDH, lactato desidrogenase. ^b CN, controle negativo; ^c FF (EAE 200 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 200 mg/kg; ^d FF (EAE 600 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 600 mg/kg; ^e FF (EAE 1000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 1000 mg/kg; ^f FF (EAE 2000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 2000 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo CN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Tabela 24: Avaliação de parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade aguda em ratos fêmeas tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila

Parâmetros ^a	CN ^b	FF (EAE 200 mg/kg) ^c	FF (EAE 600 mg/kg) ^d	FF (EAE 1000 mg/kg) ^e	FF (EAE 2000 mg/kg) ^f
Hb ^a (g/dL)	13,84 ± 0,28	14,89 ± 0,29	15,52 ± 0,52	15,96 ± 0,29	15,23 ± 0,64
Htm ^a (x 10 ⁶ / uL)	7,21 ± 0,01	7,17 ± 0,04	7,21 ± 0,01	7,24 ± 0,04	7,24 ± 0,04
VCM ^a (fL)	63,52 ± 1,04	67,02 ± 1,44	67,86 ± 1,14	60,86 ± 1,46	63,87 ± 1,70
HCM ^a (pg)	19,19 ± 0,36	20,79 ± 0,45	21,54 ± 0,72	22,03 ± 0,39	21,05 ± 0,88
CHCM ^a (g/dL)	30,25 ± 0,57	31,08 ± 0,67	31,87 ± 1,32	36,36 ± 0,99	33,25 ± 1,88
Hct ^a (%)	45,80 ± 0,80	48,00 ± 0,89	48,90 ± 0,85	44,10 ± 1,10	46,20 ± 1,19
LT ^a (x 10 ³ / uL)	4210,00 ± 17,06	3625,00 ± 13,21	3870,00 ± 165,36	3750,00 ± 231,17	4175,00 ± 218,99
Ba ^a (%)	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,02
Eo ^a (%)	1,70 ± 0,21	1,70 ± 0,21	1,90 ± 0,28	1,10 ± 0,10	1,30 ± 0,15
Mo ^a (%)	9,50 ± 0,81	6,40 ± 1,07	5,60 ± 0,88	11,60 ± 1,39	11,60 ± 1,39
Li ^a (%)	35,80 ± 1,94	35,60 ± 2,40	34,80 ± 1,58	32,70 ± 2,45	35,60 ± 1,39
Ne ^a (%)	51,90 ± 2,30	54,40 ± 2,68	54,10 ± 2,14	50,00 ± 3,39	48,80 ± 2,00

^a Hb, Concentração de hemoglobina; Htm, número de células (hematimetria); índices hematimétricos (VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração média da hemoglobina corpuscular); Hct, volume de células (hematócrito); LT, leucometria total; leucometria específica (tipos celulares: Ba, basófilo; Eo, eosinófilo; Mo, monócito; Li, linfócito; Ne, neutrófilo). ^b CN, controle negativo; ^c FF (EAE 200 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 200 mg/kg); ^d FF (EAE 600 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 600 mg/kg); ^e FF (EAE 1000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 1000 mg/kg); ^f FF (EAE 2000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 2000 mg/kg). Valores indicam média ± erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa (p<0,01) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo CN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

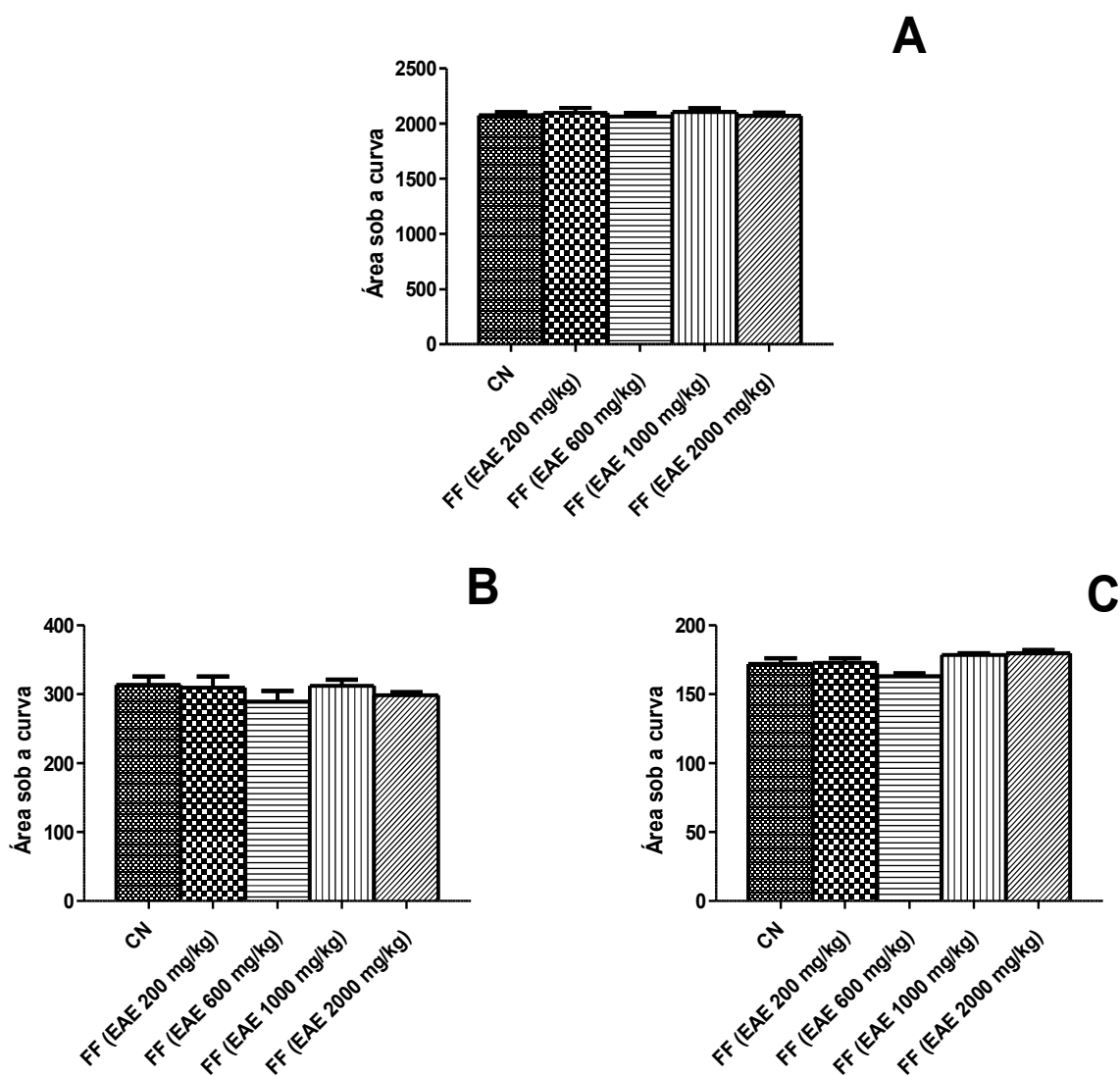


Gráfico 15: Área sob a curva de evolução da massa corporal (**A**), consumo de ração (**B**) e consumo de água (**C**) em ratos fêmeas normais tratados com formulação farmacêutica oral contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* em diferentes concentrações. Estudo de toxicidade aguda em fêmeas. CN, controle negativo; FF (EAE 200 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 200 mg/kg; FF (EAE 600 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 600 mg/kg; FF (EAE 1000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 1000 mg/kg; FF (EAE 2000 mg/kg), animais tratados com formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila na concentração de 2000 mg/kg). Valores indicam média \pm erro padrão da média, com n de 6 animais por grupo. *representa redução significativa ($p < 0,01$) dos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo CN (ANOVA seguida de teste de Tuckey).

Os parâmetros asseguram uma ampla faixa terapêutica, já que nem em machos, nem em fêmeas foram observadas alterações bioquímicas e hematológicas. A manutenção da massa corporal e o consumo regular de ração e água ao longo dos 14 dias de avaliação refletem a homeostase desses animais, assegurando a biossegurança da formulação farmacêutica testada.

6 CONCLUSÃO

Inicialmente, o tratamento de ratos diabéticos induzidos por estreptozocina com extrato em acetato de etila das folhas de *Cecropia pachystachya* permitiu, a redução da glicemia de jejum após 30 dias. A redução permaneceu constante e significativa ao longo de seis meses de tratamento com esse extrato.

Além disso, animais diabéticos tratados com o extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* apresentaram normalização dos níveis plasmáticos de insulina, fato que pode ser associado, em parte, à preservação da massa celular nas ilhotas pancreáticas desses animais. Ao contrário, desses animais, aqueles que foram induzidos ao diabetes com estreptozocina, porém, não receberam nenhum tipo de tratamento, apresentaram níveis glicêmicos elevados e redução na insulina plasmática, em consequência da reduzida massa celular em suas ilhotas pancreáticas

A identificação e quantificação dos três padrões moleculares, ácido clorogênico, isoorientina e orientina, com base em estudos já publicados anteriormente, permitiu atribuir parte dessa atividade hipoglicemiante a uma sensibilização da insulina e estímulo da sua secreção, além do aumento da captação periférica de glicose, por inibição de AMPK, e redução da absorção intestinal de glicose no momento pós-prandial.

Foi possível ainda perceber que glicogênese e via glicolítica mantiveram-se preservadas, em razão do controle da gliconeogênese. O extrato em acetato de etila também inibiu a enzima glicose 6-fosfatase, atuando dessa forma, na homeostasia da glicose.

Além de tudo isso, o extrato em acetato de etila apresentou expressiva atividade antioxidante in vitro e in vivo. Essa atividade foi atribuída, em parte, à presença dos compostos fenólicos e flavonoides identificados e quantificados previamente.

Diante desses resultados, foi desenvolvida uma formulação farmacêutica líquida que continha o extrato em acetato de etila. Foram realizados diversos estudos a fim de se determinar a concentração ideal do adjuvante de viscosidade e

do extrato, chegando-se a uma única formulação.

A formulação farmacêutica contendo o extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya* foi desenvolvida com o objetivo de se melhorar a absorção desse extrato, potencializando suas ações hipoglicemiante e antioxidante.

A formulação farmacêutica contendo extrato em acetato de etila de *Cecropia pachystachya*, além de manter os níveis glicêmicos reduzidos ao longo do tratamento, manteve o mesmo padrão já observado para o extrato, normalizando os níveis de insulina, aumentando a massa celular das ilhotas pancreáticas e mantendo o sistema antioxidante íntegro. Esse comportamento manteve-se mesmo após a interrupção do tratamento com a formulação, mostrando seu potencial hipoglicemiante e antioxidante a longo prazo.

Além disso, o tratamento prévio com a formulação farmacêutica evitou que a glicemia de animais que foram induzidos posteriormente com estreptozocina aumentasse de maneira significativa. Ratos que foram tratados previamente com a formulação farmacêutica e depois foram submetidos à indução com estreptozocina, não apresentam hiperglicemia significativa como aqueles que não receberam nenhum tipo de tratamento prévio. Isso mostra que a formulação exerce um efeito protetor sobre as ilhotas pancreáticas, alvo direto da estreptozocina durante a indução.

Os resultados mostraram que a formulação farmacêutica pode ser indicada como um fitoterápico adjuvante no tratamento do diabetes melito. A vantagem desse fitoterápico consiste no fato de que é necessária apenas uma dose diária para manter controlados os níveis glicêmicos, ao contrário da maioria dos tratamentos hipoglicemiantes orais disponíveis atualmente no mercado. A incorporação do extrato obtido a partir de folhas de *Cecropia pachystachya* a uma formulação contendo um agente de viscosidade, potencializou os efeitos hipoglicemiante e antioxidante desse extrato, sem causar nenhuma alteração bioquímica ou histológica.

Dessa forma, *Cecropia pachystachya* pode se tornar uma espécie de planta promissora como adjuvante para o tratamento do diabetes melito.

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-BARRY, J.A.; ABDEL-HASSAN, I. A; AL-HAKIEM, M. H. H. 1997. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* in normal and alloxan induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 58: 149 – 155
- ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2005. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, Suplemento 28: 37 – 72
- ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2008. All about diabetes (Online). [acesso 2013 maio 30]. Disponível em <http://diabetes.org/aboutdiabetes.jsp>
- ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2013. Standards of medical care for diabetes. *Diabetes Care*, 17: 1514 – 1522
- AFIFI, A.F., KHALIL, E., ABDALLA, S. 1999. Effect from isoorientin isolated from *Arum palestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. *Journal of Ethnopharmacology* 65 (2): 173 – 177
- AIRES, M. M. 2012. Fisiologia endócrina. In: *Fisiologia*. 4 Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro:, RJ. 1352 p.
- AL-SHAMSI, M.; AMIN, A.; ADEGHATE, E. 2006. Vitamin E ameliorates some biochemical parameters in normal and diabetic rats. *Annals of the New York Academy of Science*, 1084: 411 – 431
- ALHAMDAN, A.; SASTRY, S. K. 1990. Natural convection heat transfer between non-Newtonian fluids and an irregular shaped particle. *Journal of Food Process Engineering*, 13: 113 – 124
- ALI, H.; RAMAN, A; HOUGHTON, P. J. 2003. α -Amylase inhibition in Malaysian local plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Suplemento 55: S 31
- ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. 2007. Desenvolvimento de formas farmacêuticas. In: *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8ª Edição. Editora Artmed. Porto Alegre, RS. 776 p.
- ALLEN, L.V. Jr. 2000. Agentes de viscosidade. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 2 (6): 216 – 226
- ALLEN, L.V. Jr. 1998. *The Art, Science, and Technology Pharmaceutical Compounding*. Washington, DC: American Pharmaceutical Association
- ALLEN, L.V. JR. 2000. Agentes de viscosidade. *International Journal of Pharmaceutical Interface Science*, 92: 344 – 353

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

AMORI, R.E.; LAU, J.; PITTAS, A.G. 2007. Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, 298 (2): 194 – 206

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.; VÁSQUEZ, R.C. 2010. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 130 (1): 93 – 97

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

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. 2009. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71: 505 – 518

ANSEL, H.; ALLEN, J.R; POPOVICH, N. G. 2000. *Farmacotecnica-formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6 ed. São Paulo: Premier, 568p.

ANSEL, H.; ALLEN, J.R; POPOVICH, N.G. 1995. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. U.S.A Williams e Witkins. 6 ed., 514p.

ARAGÃO, D.M.O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J.C.; GARCIA, R.M.G.; SCIO, E. 2010. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 128 (3): 629 – 633

ARAGNO, M.; TAMAGNO, E.; GATTO, V.; BRIGNARDELLO, E.; PAROLA, S.; DANNI, O.; BOCCUZZI, G. 1999. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (11-12): 1467 – 1474

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

AREND, D.P. 2010. Desenvolvimento de sistema microestruturado contendo extrato padronizado de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 174p.

ARGENTINIAN NATIONAL PHARMACOPEIA. 1978. Sixth ed., Buenos Aires, p. 101.
ASANE, G. S.; NIRMAL, S. A.; RASAL, K. B.; NAIK, A. A.; MAHADIK, M. S.; MADHUSUDAN RAO, Y. 2008. Polymers for Mucoadhesive Drug Delivery System: A Current Status. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34: 1246 – 1266

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

BAHIA, L.R.; ARAUJO, D.V.; SCHAAN, B.D.; DIB, S.A.; NEGRATO, C.A.; LEÃO, M.P.; RAMOS, A.J.; FORTI, A.C.; GOMES, M.B.; FOSS, M.C.; MONTEIRO, R.A.; SARTORELLI, D.; FRANCO, L.J. 2011. The costs of type 2 diabetes mellitus outpatient care in the Brazilian public health system. *Value Health Region Issues*, 14 (5): 137 – 140

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

BALFOUR, J.A.; McTAVISH, D. 1993. Acarbose. An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus. *Drugs*, 46 (6): 1025 – 1054

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

BARBOSA, N.B.; ROCHA, J.B.; WONDRAČEK, D.C.; PEROTTONI, J.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. 2006. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*, 163 (3): 230 – 238

- BASSOLI, B.K.; CASSOLLA, P.; BORBA-MURAD, G.R.; CONSTANTIN, J.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.; BAZOTTE, R.B.; da SILVA, R.S.; de SOUZA, H.M. 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function*, 26: 320 – 328
- BAWDEN, K.; QUANT, J.; RAMAN, A. 2002. Investigation of the inhibitory effects of plant extracts on a starch α -amylase assay. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Suplemento 54: S 80
- BAWDEN, K.; QUANT, J.; RAMAN, A. 2003. Fractionation and characterisation of compounds inhibiting α -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 complication in diabetes. *Diabetes*, 40: 405 – 412
- BELL Jr, R.H.; HYE, R.J.; MIYAI, K. 1984. Streptozotocin-induced liver tumors in the Syrian hamster. *Carcinogenesis*, 5 (10): 1235 – 1238
- BENNETT, R.A.; PEGG, A.E. 1981. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Research*, 41 (7): 2786 – 2790
- BEUTLER, E. 1975. *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods*. Second edition. Grune & Stratton New York.
- BLICKLE, J.F. 2006. Meglitinide analogues: a review of clinical data focused on recent trials. *Diabetes and Metabolism*, 32 (2): 113 – 120
- BOLEN, S.; FELDMAN, L.; VASSY, J.; WILSON, L.; YEH, H.C.; MARINOPOULOS, S.; WILEY, C.; SELVIN, E.; WILSON, R.; BASS, E. B.; BRANCATI, F. L. 2007. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*, 147 (6): 386 – 399
- BOLZAN, A.D.; BIANCHI, M.S. 2002. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research*, 512 (2-3): 121 – 134
- BRASIL. 2003. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF
- BRASIL. 2006. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF (Série B, Textos Básicos de Saúde)

BRASIL. 2010. Orientações sobre “Controle de Qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf> Acesso em 15 de janeiro de 2015

BRASIL. 2011. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011-2022. Brasília, DF (Série B, Textos Básicos de Saúde).

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

BURI, P. 1999. Disponibilização dos princípios ativos no organismo a partir das formas farmacêuticas destinadas à administração por via oral. In: LE BLANC P. P.; AIACHE, J. M.; BESNER, J. G.; BURI, P.; LESNE, M. I. *Tratado de biofarmácia e farmacocinética* Lisboa: instituto Piaget

BUSE, J.B.; ROSENSTOCK, J.; SESTI, G.; SCHMIDT, W.E.; MONTANYA, E.; BRETT, J.H.; ZYCHMA, M.; BLONDE, L. 2009. Liraglutide once a day versus exenatide twice a day for type 2 diabetes: a 26-week randomized, parallel-group, multinational, open-label trial (LEAD-6). *The Lancet*, 274 (9683): 39 – 47

CALIXTO, J.B. 2010. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agent). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33 (2): 179 – 189

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology*, 113: 484 – 490

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 flavonoides 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.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova*, 21 (1): 99 – 105

CHEN, V.; IANUZZO, C.D. 1982. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 60: 1251 – 1256

CHEN, V.; IANUZZO, C.D. 1982. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 60: 1251 – 1256

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

CHIARELLI, F.; DI MARZIO, D. 2008. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vascular Health and Risk Management*, 4 (2): 297 – 304

CHIASSON, J.L.; JOSSE, R.G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. 2003. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance. The STOP-NIDDM Trial. *The Journal of the American Medical Association*, 290: 486 – 494

CHUN, O.K.; KIM, D.O.; SMITH, N.; SCHOROEDER, D.; HAN, J.T.; LEE, C.H. 2005. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1715 – 1724

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. Cardiostimulant 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.

CRUZ, E.M.; SILVA, E.R.; MAQUIAVELI, C.C.; ALVES, E.S.S.; LUCON Jr., J.F.; REIS, M.B.G.; TOLEDO, C.E.M.; CRUZ, F.G.; VANNIER-SANTOS, M.A. 2013. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. *Phytochemistry*, 89: 71 – 77

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.

da SILVA, J. T. R. 2008. Chuva de sementes em ambientes perturbados e não-perturbados na Floresta de Mata Atlântica do sul da Bahia, Brasil. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Recursos Florestais com opção em Conservação de Ecossistemas Florestais. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP. 83 p.

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

DCCT, DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL. 1993. Research Group: The effect of intensive treatment of Diabetes on the development and progression of the long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 329 (14): 977 – 986

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

DOMINGUEZ, C.; RUIZ, E.; GUSSINYE, M.; CARRASCOSA, A. 1998. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*, 21: 1736 – 1742

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

DONG, M.W. 2006. Regulatory aspects of HPLC analysis: HPLC system and method validation. In DONG MW (org.) *Modern HPLC for practicing scientists*. John Wiley & Sons, p. 230

DORMANDY, J.A.; CHARBONNEL, B.; ECKLAND, D.J.; ERDMANN, E.; MASSI-BENEDETTI, M.; MOULES, I.K.; SKENE, A.M.; TAN, M.H.; LEFÈBVRE, P.J.; MURRAY, G.D.; STANDL, E.; WILCOX, R.G.; WILHELMSSEN, L.; BETTERIDGE, J.; BIRKELAND, K.; GOLAY, A.; HEINE, R.J.; KORÁNYI, L.; LAAKSO, M.; MOKÁŇ, M.; NORKUS, A.; PIRAGS, V.; PODAR, T.; SCHEEN, A.; SCHERBAUM, W.; SCHERNTHANER, G.; SCHMITZ, O.; ŠKRHA, J.; SMITH, U.; TATOŇ, J. 2005. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *The Lancet*, 366 (9493): 1279 – 1289

DORMUTH, C.R.; CARNEY, C.; CARLETON, B.; BASSETT, K.; WRIGHT, J. 2009. Thiazolidinediones and fractures in men and women. *Archives of Internal Medicine*, 169 (15): 1395 – 1402

- EBARA, T.; HIRANO, T.; MAMO, J.C.; SAKAMAKI, R.; FURUKAWA, S.; NAGANO, S.; TAKAHASHI, T. 1994. Hyperlipidemia in streptozocin-diabetic hamsters as a model for human insulin-deficient diabetes: comparison to streptozocin- diabetic rats. *Metabolism*, 43 (3): 299 – 305
- 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
- EL-SWEFY, S.; SCHAEFER, E.J.; SEMAN, L.J.; VAN, D.D.; SEVANIAN, A.; SMITH, D.E.; ORDOVAS, J.M.; EL-SWEIDY, M.; MEYDANI, M. 2000. The effect of vitamin E, probucol, and lovastatin on oxidative status and aortic fatty lesions in hyperlipidemic-diabetic hamsters. *Atherosclerosis*, 149 (2): 277 – 286
- ELSNER, M.; GULDBAKKE, B.; TIEDGE, M.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*, 43 (12): 1528 – 1533
- 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
- FERREIRA, A. O. 2002. *Guia prático da farmácia magistral*. 2 ed. Juiz de Fora: Oesp Gráfica S.A, 2002, 845p.
- FÖRSTERMANN, U. 2008. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 5 (6): 338 – 349
- FRANKEL, E. N. 2005. *Lipid oxidation*. 2.ed. Bridgwater: Oily Press. p. 391-405. *Oily Press lipid library*, v.18.
- 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
- GECOL, H.; ERGICAN, E.; MIAKATSINDILA, P. 2005. Biosorbent for tungsten species removal from water: Effects of co-occurring inorganic species. *Journal of Colloid and Compounding*, 2 (6): 216 – 226

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

GILBERT, M.P.; PRATLEV, R.E. 2009. Efficacy and safety of incretin-based therapies in patients with type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*, 20: S 309 – 318

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

GLASGOW, R.E.; WAGNER, E.H.; KAPLM, R.M.; VINICOR, F.; SMITH, L. NORMAN, J. 1999. If diabetes is a public health problem, why not treat it as one? A population-based approach to chronic illness. *Annals of Behavioral Medicine*, 21 (2): 159 – 170

GLIKSMAN, M. 1980. *Food hydrocollids*. v. 1. Florida: CRF Press

GOLDIN, E.; ARDITE, E.; ELIZALDE, J.I.; ODRIUZOLA, A.; PANÉS, J.; PIQUÉ, J.M.; FERNANDEZ-CHECA, J.C. 1997. Gastric mucosal damage in experimental diabetes in rats role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*, 112: 855 – 863

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

GUNADHARINI, D.N.; ELUMALAI, P.; ARUNKUMAR, R.; SENTHILKUMAR, K.; ARUNAKARAN, J., 2011. Induction of apoptosis and inhibition of PI3K/Akt pathway in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells by ethanolic neem leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 134: 644 – 650

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4.ed.. New York: Clarendon Press; Oxford University Press. p. 617-638. Oxford Science Publication.

HARA, K.; IIDA, M.; YANO, K.; NISHIDA, T. 2004. Metal ion absorption of carboxymethylcellulose gel formed by g-ray irradiation for the environmental purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38: 227 – 230

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

HEMENEGILDO, C.; RAYA, ^a; ROMA, J.; ROMERO, F.J. 1993. Decrease glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochemical Research*, 18: 893 – 896

HEMKENS, L.G.; GROUVEN, U.; BENDER, R.; GUNSTER, C.; GUTSCHMIDT, S.; SELKE, G.W.; SAWICKI, P.T. 2009. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulina analogues: a cohort study. *Diabetologia*, 52: 1732 – 1744

HENRIKSEN, E. J. 2002. Therapeutic effects of lipoic acid on hyperglycemia and insulin resistance. In: CADENAS, E.; PACKER, L. (editors). *Handbook of Antioxidants*. New York: Marcel Dekker. p. 535 – 547

HERMES-LIMA, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B. (ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319 – 368

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

HOLMAN, R.R.; FARMER, A.J.; DAVIES, M.J.; LEVY, J.C.; DARBYSHIRE, J.L.; Keenan, J.F.; Paul, S.K. 2009. Three-year efficacy of complex insulin regimens in type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* , 361: 1736 – 1347

HOLSTEIN, A.; PLASCHKE, A.; EGBERTS, E.H. 2001. Lower incidence of severe hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepiride versus glibenclamide. *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 17 (6): 467 – 473

HOME, P.D.; POCOCK, S.J.; BECK-NIELSEN, H.; CURTIS, P.S.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; JONES, N.P.; KOMAJDA, M.; McMURRAY, J. 2009. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *The Lancet*, 373 (9681): 2125 – 2135

HOPKINS, P.N.; WU, L.L.; HUNT, S.C.; BRINTON, E.A. 2005. Plasma Triglycerides and Type III Hyperlipidemia Are Independently Associated With Premature Familial Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 45 (7): 1003 – 1012

HORI, M.; TAKAHASHI, M.; HIRAOKA, N.; YAMAJI, T.; MUTOH, M.; ISHIGAMORI, R.; FURUTA, K.; OKUSAKA, T.; SHIMADA, K.; KOSUGE, T.; KANAI, Y.; NAKAGAMA, H. 2014. Association of Pancreatic Fatty Infiltration With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Citation: *Clinical and Translational Gastroenterology*, 5: 1 – 5

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://www.arvores.brasil.nom.br/new/embauba/cecropiapachystachya>. Acesso em 26 de Janeiro de 2015.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em: http://ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1. Acessado em 05 de janeiro de 2015

IDF, INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. 2012. *Diabetes Atlas*, 5th ed. International Diabetes Federation, Brussels.

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

JAIN, S.K. 1989. The neonatal erythrocyte and its oxidative susceptibility. *Seminars in Hematology*, 26 (4): 286 – 300

JONES, D. P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8 (9/10): 1865 – 1879

JONES, J.D.; CHAMBLISS, M.L. 2000. Hypertriglyceridemia and coronary heart disease. *Archives of Family Medicine*, 9 (2): 189 – 190

JUNIOR, J.F.L. 2013. Avaliação da atividade microbicida de extratos vegetais sobre *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP. 42p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. 2013. Técnicas básicas de citologia e histologia. 12ª Edição. Santos, SP.

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

KANIAS, T.; WONG, K.; ACKER, J.P. 2007. Determination of Lipid Peroxidation in Desiccated Red Blood Cells. *Cell Press Technology*, 5 (3): 165 – 174

KARTHIKESAN, K.; PARI, L.; MENON, V.P. 2010. Antihyperlipidemic effect of Chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin in rats subjected to diabetogenic agents. *Chemical-Biological Interactions*, 188 (3): 643 – 650

KEFAS, B.A.; CAI, Y.; KERCKHOFS, K.; LING, Z.; MARTENS, G.; HEIMBERG, H.; KELLER, J. D. 1983. Sodium carboxymethylcellulose (CMC). In: *Food Hydrocolloids*, v. 3. Ed. M. Glicksman. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p. 43 – 109

KELLER, K. 1996. Herbal medicinal products in Germany and Europe: experiences with national and European assessment. *Drug Information Journal*, 30: 933 – 948

KENSLER, T.W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. 2007. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47: 89 – 116

KHADER, Y.S.; BATIEHA, A.; EL-KHATEEB, M.; AL OMARI, M.; AJLOUNI, K. 2010. Prevalence of dyslipidemia and its associated factors among Jordanian adults. *Journal of Clinical Lipidology*, 4 (1): 53 – 58

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

KOBAYASHI, K.; SAITO, Y.; NAKAZAWA, I.; YOSHIZAKI, F. 2000a. 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. 2000b. 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

KOIDE, H.; ODA, T. 1959. Pathological occurrence of glucose-6-Phosphatase in serum in liver diseases. *Clinica Chimica Acta*, 4: 554 – 561

KOOY, A.; JAGER, J.; LEHERT, P.; BETS, D.; WULFELLÉ, M.G.; DONKER, A.J.M.; STEHOUWER, C.D.A. 2009. Long-term effects of metformin on metabolism and microvascular and macrovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Archives of Internal Medicine*, 169 (6): 616 – 625

KOVAC, V.; PEKIC, B. 1991. Proanthocyanidols from grape and wine. *Contemporary Agriculture*, 39 (4): 5 – 17

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

LABA, D. 1993. *Reological properties of cosmetics and toiletries*. New York: Marcel Dekker, p. 9 – 31

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

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, J.L.; KANING, J.L. 2001. *Teoria e Prática na indústria Farmacêutica*. Lisboa, Fundação Calouste-Guilberkian. 20 ed. II vol, 1517p.

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

LAURINDO, F. R. M. 2005. Desequilíbrio redox, resposta vascular à lesão e aterosclerose. In: LUZ, P. L.; LAURINDO, F.R. M. CHAGAS, A. C. P. *Endotélio & doenças cardiovasculares*. São Paulo: Atheneu. Cap. 9, p. 115 – 132

LEAL, P.F.; BRAGA, M.E.; SATO, D.N.; CARVALHO, J.E.; MARQUES, M.O.; MEIRELES, M.A. 2003. Functional properties of specie extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51 (9): 2520 – 2525

LEE, S.; KIM, D.H.; LEE, C.H.; JUNG, J.W.; SEO, Y.T.; JANG, Y.P.; RYU, J.H. 2010. Antidepressant-like activity of the aqueous extract of *Allium macrostemon* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 386 – 395

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. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216 – 226
- 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
- LI, C.; XIA, J.; ZHANG, G.; WANG, S.; WANG, L. 2009. Nateglinide versus repaglinide for type 2 diabetes mellitus in China. *Acta Diabetologica*, 46 (4): 325 – 333
- 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
- LIBBY, G.; DONNELLY, L.A.; DONNAN, P.T.; ALESSI, D.R.; MORRIS, A.D.; EVANS, J.M. 2009. New users of metformin are at low risk of incident cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 32: 1620 – 1625
- 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
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 37 (3): 293 – 303
- LOKE, Y.K.; SINGH, S.; FURBERG, C.D. 2009. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. *Canadian Medical Association Journal*, 180 (1): 32 – 39
- MALAISSE, W.J.; LEBRUN, P. 1990. Mechanisms of sulfonylurea-induced insulin release. *Diabetes Care*, 13 (supplement 3): 9 – 17
- MARITIM, A., C.; SANDRES, R., A.; WATKINS, J. B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and Antioxidants: A Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17: 24 – 38
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. *Phytomedicine*, 2 (2): 137 – 189
- MATHE, D. 1995. Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diabetes and Metabolism*, 21 (2): 106 – 111
- MENDES, J.D.; RAMOS, H.G. 1994. Animal models in diabetes research. *Archives of Medical Research*, v. 25 (4): 367 – 375

- MENEGHINI, R. 1987. A toxicidade do oxigênio. *Ciência hoje*, 5: 57 – 62
- MOHAN, I.K.; DAS, U.N. 1998. Effect of L-arginine-nitric oxide system on chemical-induced diabetes mellitus. *Free Radical Biology and Medicine*, 25 (7): 757 – 765
- MONAMI, M.; MARCHIONNI, N.; MANNUCCI, E. 2009. Glucagonlike peptide-1 receptor agonists in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Endocrinology*, 160: 909 – 917
- MONTI, M.C.; LONSDALE, J.T.; MONTOMOLI, C.; MONTROSS, R.; SCHALAG, E.; GREENBERG, D.A.. 2007. Familial Risk Factors for Microvascular Complications and Differential Male-Female Risk in a Large Cohort of American Families with Type 1 Diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92 (12): 4650 – 4655
- MORDES, J.P.; ROSSINI, A.A. 1981. Animal models of diabetes. *The American Journal of Medicine*, 70: 353 – 360
- NATHAN, D.M.; BUSE, J.B.; DAVIDSON, M.B.; FERRANNINI, E.; HOLMAN, R.R.; SHERWIN, R.; ZINMAN, B. 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 32 (1): 193 – 203
- NEGRI, G. 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41 (2): 121 – 142
- 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
- NOEL, P.H.; PUGH, J.A.; LARME, A.C.; MARSH, G. 1997. The use of traditional plant medicines for non-insulin-dependent Diabetes mellitus in south Texas. *Phytotherapy Research*, 11: 512 – 517
- O'DONNELL, V.B.; FREEMAN, B.A. 2001. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways. *Circulation Research*, 88: 12 – 21
- ODETTI, P.; PESCE, C.; TRAVERSO, N.; MENINI, S.; MAINERI, E.P.; COSSO, L.; VALENTINI, S.; PATRIARCA, S.; COTTALASSO, D.; MARINARI, U.M.; PRONZATO, M.A. 2003. Comparative trial of N-acetyl-cysteine, taurine, and oxerutin on skin and kidney damage in long-term experimental diabetes. *Diabetes*, 2: 499 – 505
- OHAERI, O.C. 2001. Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. *Bioscience Reports*, 21: 19 – 24

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.

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 Science*, 67 (14): 1695 – 1705

ONG, K.W.; HSU, A.; KWONG, B.; TAN, H. 2013. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. *Biochemical Pharmacology*, 85: 1341 – 1351

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

PATEL, R.; SHERVINGTON, A.; PARIENTE, J.A.; MARTINEZ-BURGOS, M.A.; SALIDO, G.M.; ADEGHATE, E.; SINGH, J. 2006. Mechanism of exocrine pancreatic insufficiency in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1084: 71 – 88

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

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-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

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

PICKUP, J.C.; WILLIAMS, C. 1997. *Textbook of diabetes*. 2nd Ed. Blackwell Science

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

PIFFAR, P.M. ; FERNANDEZ, R.; TCHAIKOVSK J.O. ; HIRABARA, S.M.; FOLADOR, A.; JAKOBI, S.; GOBBOBORDON, D.; PINTO, G.J.; FABRÍCIO, T.V.; TOSTA, E.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. 2003. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats.. *Cancer Letters*, 201: 139 – 148

PIGMAN, W.; HORTON, D. 1970. *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*. Second Edition, Vol. IIA. N.Y.: Academic Press, p. 385 – 433

PILIZOTA, V.; SUBARIC, D.; LOVRIC, T. 1996. Rheological properties of CMC dispersions at low temperatures. *Food Technology and Biotechnology*, 34 (2–3): 87 – 90

PLANK, J.; SIEBENHOFER, A.; BERGHOLD, A.; JEITLER, K.; HORVATH, K.; MRAK, P.; PIEBER, T.R. 2005. Systematic review and meta-analysis of short-acting insulin analogues in patients with diabetes mellitus. *Archives of Internal Medicine*, 165 (12): 1337 – 1344

PRISTA, N. L.; ALVES, A.; POPOVICH, N. G. 1990. *Técnica farmacêutica e farmácia galênica*. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulberkian, v. 3.

PRISTA, N. L.; ALVES, A.; POPOVICH, N. G. 1992 *Técnica farmacêutica e farmácia galênica*. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulberkian, v. 1

RABELO, D.S.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. 2013. Quantificação de fenóis totais presentes nas cascas de *Trichillia catigua* A. Juss (Meliaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15 (2): 230 – 236

RACHMANI, R.; SLAVACHEVSKI. I.; LEVI, Z.; ZADOK, B.S.; KEDAR, Y.; RAVID, M. 2002. Metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: reconsideration of traditional contraindications. *European Journal of Internal Medicine*, 13: 428 – 433

RAHMAN, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2): 219 – 236

RAMALHO, A.C.R. 2002. Insulina e Antidiabéticos Orais. 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

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. *Farmacologia*. Elsevier, 6ª ed. 2007.

- RAO, B.K.; KESAVULU, M.M.; APPARAO, C.H. 2001. Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 78: 67 – 71
- RAUSCHER, F.M.; SANDERS, R.A.; WATKINS, J.B. III. 2000. Effects of new antioxidant compounds PNU-104067F and PNU-74389G on antioxidant defense in normal and diabetic rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14 (4): 189 – 194
- RAYAT, G.R.; SINGH, B.; KORBUTT, G.S.; RAJOTTE, R.V. 2000. Single injection of insulin delays the recurrence of diabetes in syngeneic islettransplanted diabetic NOD mice. *Transplantation*, 70 (6): 976 – 985
- REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. 2005. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 22 (4): 359 – 370
- 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
- REYES, A. E. L. 2004. *Cecropia pachystachya* Trec. Disponível em: < <http://www.esalp.usp.br/trilhas/medicinal/am26.php?PHPSESSID=86614b7ecb55f04148a10610a3654c1b> > Acesso em: 23 de dezembro de 2014
- 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.
- RIBEIRO, M.R.F.; MORY, D.B.; VENDRAMINI, M.F.; DIB, S.A.; MOISÉS, R.S.; CHACRA, A.R. 2009. Diabetes Melito. In: LOPES, A.C.; eds. *Tratado de clínica médica*. 2 Edição. Editora Roca. Rio de Janeiro, RJ. p. 3546 – 3571
- 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 glazioui* Sneth and its constituents – In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine*, 14 (6): 396 – 402
- RODRIGUEZ de SOTILLO, D.V.; HADLEY, M. 2002. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 717 – 726

- RUHE, R. C.; McDONALD, R. B. 2001. Use of Antioxidant Nutrient in the Prevention and Treatment of type 2 diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, 20 (5): 363S – 369S
- 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
- SCHINITZLER, P.; SCHUHMACHER, A.; ASTANI, A.; REICHLING, J. 2008. Melissa officinalis oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15 (9): 734 – 740
- SCHMIDT, A.M.; STERN, D. 2000. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21 (10): 367 – 369
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. 2002. Plantas Mediciniais, Fitomedicamentos e Fitoterapia. In: *Fitoterapia Racional*. 1ª Edição brasileira. Editora Manole, São Paula, SP.386 p.
- SCHWAB, D., HERLING, A.W., HEMMERLE, H., SCHUBERT, G., HAGENBUCH, B., BURGER, H.J., 2001. Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivatives by the organic anion transport proteins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296: 91 – 98
- SCHWARTZ, S.; FONSECA, V.; BERNER, B.; CRAMER, M.; CHIANG, Y.K.; LEWIN, A. 2006. Efficacy, tolerability, and safety of a novel once-daily extended-release metformin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29 (4): 759 – 764
- SELEY, J. J.; WEINGER, K. 2007. The state of the science on nursing best practices for diabetes self management. *The Diabetes Educator*, 33 (4): 616 – 626
- SELVIN E, BOLEN S, YEH HC, WILEY C, WILSON LM, MARINOPOULOS SS, FELDMAN, L.; VASSY, J.; WILSON, R.; BASS, E. B.; BRANCATI, F. L. 2008. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Archives of Internal Medicine*, 168 (19): 2070 – 2080
- SHALABY, W.S.; SHAH, K.R. 1991. Chemical Modifications of Natural Polymers and their Technological Relevance. In: *Water-Soluble Polymers, Syntheses, Solution Properties and Applications*. Washington D.C.: Shalaby, W.S., ACS, Series 467, p. 74 – 80

SHUKLA, S.; SALUJA, A.K.; PANDYA, S.S. 2009. Antioxidant activity and free radical scavenging potential of *Gmelina arborea* LINN. *Pharmacology on line*, 1: 1035 – 1043

SIES, H. 1985. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*, edited by Sies H. London, Academic Press: London, 1985, p.1 – 8

SILVA, A.R.; RUSCHEL, C.; HELEGDA, C.; BRUSQUE, A.M.; WANNMACHES, C.M.D.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, C.S. 1999. Inhibition of rat brain lipid synthesis in vitro by 4-hydroxybutyric acid. *Metabolic Brain Disease*, 14: 157 – 164

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

SILVEIRA, J.A.A.; RESENDE, H.M.P.; LUCENA-FILHO, A.M.; PEREIRA, J.G. 2010. Características de assistência à saúde a pessoas com Diabetes mellitus acompanhadas na Unidade de Saúde da Família Pedregal II, em Cuiabá, MT: reflexões para a equipe de saúde. *O mundo da saúde*, 34 (1): 43 – 49

SIMIONESCU, M.; POPOV, D.; SIMA, A.; HASU, M.; COSTACHE, G.; FAITAR, S.; VULPANOVICI, A.; STANCU, C.; STERN, D.; SIMIONESCU, N. 1996. Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. The hyperlipemic-hyperglycemic hamster. *The American Journal of Pathology*, 148 (3): 997 – 1014

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.

SINGH, N.; ARMSTRONG, D.G.; LIPSKY, B.A. 2005. Preventing Foot Ulcers in Patients With Diabetes. *The Journal of the American Medical Association*, 293 (2): 217 – 228

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

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. 2012. Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2007 (Online). [acesso 2013 maio 30]. Disponível em <http://diabetes.org.br/politicas/diretrizesonline.php>

SORARU, S.B., BANDONI, A.L., 1978. *Plantas de la medicina popular argentina*. Editorial Albatros, Buenos Aires.

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

STALMANS, W.; CADEFAU, J.; WERA, S.; BOLLEN, M. 1997. New insight into the regulation of liver glycogen metabolism by glucose. *Biochemical Society Transactions*, 25 (1): 19 – 25

STEIN, O.; STEIN, Y. 1999. Atheroprotective mechanisms of Hdl. *Atherosclerosis*, 144: 285 – 303

STREGE, M.A. 1999. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. *Journal of Chromatography B*, 725: 67 – 78

SZKUDELSKI, T. 2001. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*, 50: 536 – 546

TAKASU, N.; KOMIYA, I.; ASAWA, T.; NAGASAWA, Y.; YAMADA, T. 1991. Streptozotocin and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes*, 40 (9): 1141 – 1145

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

TIETZ. 1994. *Textbook of Clinical Chemistry*, Burtis CA.; Ashwood ER. Eds, 2^a edição, Philadelphia: WB. Saunders Co

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.F.; BLOOM, S.R. 2007. Incretins and other peptides in the treatment of diabetes. *Diabetic Medicine*, 24 (3): 223 – 232

UENO, T.; YOKOTA, S.; KITAOKA, T.; WARIISHI, H. 2007. Conformational changes in single carboxymethylcellulose chains a highly oriented pyrolytic graphite surface under different salt conditions. *Carbohydrate Research*, 342: 954 – 960

UKPDS, UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. 1998. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes: UKPDS 33. *Lancet*, 352 (9131): 837 – 853

UMPIERREZ, G.E.; HOR, T.; SMILEY, D.; TEMPONI, A.; UMPIERREZ, D.; CERON, M.; MUNOZ, C.; NEWTON, C.; PENG, L.; BALDWIN, D. 2009. Comparison of inpatient insulin regimens with detemir plus aspart versus neutral protamine hagedorn plus regular in medical patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94: 564 – 569

VALENTOVIC, M.A.; ALEJANDRO, N.; BETTS CARPENTER, A.; BROWN, P.I.; RAMOS, K. 2006. Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats. *Toxicology Letters*, 164: 214 – 220

VAN DE LAAR, F.A.; LUCASSEN, P.L.; AKKERMANS, R.P.; VAN DE LISDONK, E.H.; RUTTEN, G.E.; VAN WEEL, C. 2005. Alpha-glucosidase inhibitors for patients with type 2 diabetes: results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 28 (1): 154 – 163

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57 – 149

VARGAS HOWELL, R., ULATE MONTERO, G. 1996. Diuretic effect of *Cecropia obtusifolia* (Moraceae) on albino rats. *Revista de Biología Tropical*, 44 (1): 93 – 96

VEGA-LOPEZ, S.; DEVARAJ, S.; JIALAI, I. 2004. Oxidative stress and antioxidant supplementation in the management of diabetic cardiovascular disease. *Journal of Investigative Medicine*, 52 (1): 24 – 32

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

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

- VIEIRA, S.R.; MILLETE, J.; TOPP, G.C.; REYNOLDS, W.D. 2002. Handbook for geostatistical analysis of variability in soil and climate data. In: ALVAREZ V., V.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N.F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L.M., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.2, p.1 – 45
- 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
- WADE, A.; WELLER, P. 1994. Journal of Pharmaceutical Excipients: Handbook. 2. ed., Washington: American Pharmaceutical Association
- WAGNER, E. H.; AUSTIN, B. T.; DAVIS, C.; HINDMARSH, N.; SCHAEFER, J.; BONOMI, A. 2001. Improving Chronic Illness Care: translating evidence into action. Interventions that encourage people to acquire self-management skills are essential in chronic illness care. Health Affairs, 20 (6): 64 – 78
- WAJCHENBERG, B.L. 2002. Disfunção endotelial na diabetes tipo 2. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 46 (5): 514 – 519
- WHO, World Health and Organization. 2013. Prevalence data of diabetes worldwide. Available at <http://www.who.int/en/> (accessed 29.12.14).
- WILLIAMSON, E.; OKPAKO, D.T.; EVANS, F.J. 1996. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Wiley, Chichester
- WINTERBOURN, C.C.; HAWKINS, R.E.; BRIAN, M.; CARRELL, R.W. 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 85(2): 337 – 341
- 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
- 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

WULFFELÉ, M.G.; KOOY, A.; LEHERT, P.; BETS, D.; OGTEROP, J.C.; VAN DER BURG, B.B.; DONKER, A.J.M.; STEHOUSER, C.D.A. 2003. Effects of short-term treatment with metformin on serum concentrations of homocysteine, folate and vitamin B12 in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebocontrolled trial. *Journal of Internal Medicine*, 254: 445 – 463

YANG, B.; WANG, J.; BRAUNING, A.; DONG, Z.; ESPER, J. 2009. Late Holocene climatic and environmental changes in arid central Asia. *Quaternary International*, 194: 68 – 78

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIZUMI, S.; MATSUMURA, N.; MURAKAMI, T.; MATSUDA, H.; HORI, K.; YAMAHARA, J. 1997b. Medicinal Foodstuffs. VII1) 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 Scoparianosides A, B, and C. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45(8): 1300 – 1305

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

ZERAIK, M.L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; YARIWAKE, J.H.; ANGENOT, L.; FRANCK, T. 2011. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry*, 128: 259 – 265

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

ZHOU, X.J.; LIU, M.; YAN, J.J.; CAO, Y.; LIU, P. 2012. Antidepressant-like effect of the extract of Kai Xin San, a traditional Chinese herbal prescription, is explained by modulation of the central monoaminergic neurotransmitter system in mouse. *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 422 – 428