

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AMANDA KARINE BARROS FERREIRA

EFEITO ANTIDIABÉTICO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS CASCAS DO
CAULE DE *Terminalia catappa* (COMBRETACEAE) EM RATOS

Maceió
2013

AMANDA KARINE BARROS FERREIRA

Efeito antidiabético do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa* (Combretaceae) em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do grau em mestre em Ciências da Saúde (área de concentração: doenças crônicas).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro

Maceió
2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

F383e Ferreira, Amanda Karine Barros.

Efeito antidiabético do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa* (Combretaceae) em ratos / Amanda Karine Barros Ferreira. – 2013.

71 f. : il.

Orientadora: Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 62-71.

1. Diabetes mellitus. 2. Aloxana. 3. Plantas medicinais. 4. *Terminalia catappa*. I. Título.

CDU: 616.379-008.64:615.322



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

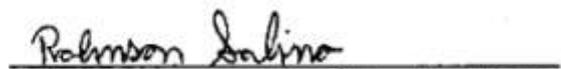
ICBS - UFAL - Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, 5/N
Cidade Universitária - Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Amanda Karine Barros Ferreira, intitulada: "Efeito anti-diabético do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de Terminalia catappa (Conbretaceae) em ratos", orientada pela Prof.ª Dr.ª Éurica Adélia Nogueira Ribeiro, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 04 de março de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata Aprovada.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho - (UNCISAL)


Prof. Dr. Robinson da Silva Sabino - (ICBS/UFAL)


Prof.ª Dr.ª Sâmia Andréia Souza da Silva - (ICBS/UFAL)

***Dedico esse trabalho aos meus queridos
pais que depositaram em mim toda
confiança e esperança.***

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro por toda paciência, conhecimento compartilhado, bons conselhos e por toda dedicação e amor ao seu trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular que ajudaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho;

A Prof^a. Dr^a. Sâmia Silva, o Prof. Dr. Robinson Sabino e o Prof. Dr. Euclídes Maurício Trindade Filho que aceitaram participar dessa banca e com isso contribuir para seu aprimoramento;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde;

A Universidade Federal de Alagoas;

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: *Diabetes Mellitus* é um transtorno metabólico crônico que associa hiperglicemia inapropriada a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Está relacionado a altos índices de morbimortalidade devido às complicações crônicas em longo prazo. Com base nestas premissas, existe um grande interesse da comunidade científica em plantas medicinais, como a *Terminalia catappa*, utilizadas como coadjuvantes no tratamento do diabetes. Afim de possibilitar a inclusão dessas plantas no sistema público de saúde e do conhecimento de seus constituintes químicos como possíveis protótipos de novos fármacos hipoglicemiantes. Diante disso, tornou-se o objetivo desse trabalho avaliar o efeito antidiabético do extrato hidroalcoólico das cascas do caule da *T. catappa* em ratos; **Métodos:** Os ratos foram randomizados em quatro grupos, não-diabético salina (NDS), não-diabético extrato (NDE), diabético salina (DS) e diabético extrato (DE), n=10. A diabetes foi induzida com aloxana (40 mg/Kg, i.v.), após 15 dias foram considerados diabéticos os ratos com glicemia de jejum superior a 200 mg/dL. Nesse momento, os grupos foram divididos (n=5), sendo metade dos ratos de cada grupo, destinados ao teste de tolerância oral à glicose e os demais destinados ao tratamento com o extrato durante 15 dias (200 mg/Kg, v.o.). Os animais foram pesados em três momentos do protocolo experimental. Ao fim do tratamento foram realizadas medidas diretas de pressão arterial e frequência cardíaca nos ratos anestesiados e em seguida foram eutanasiados sob anestesia e o sangue coletado para a realização das dosagens plasmáticas de glicose, hemoglobina glicada, lipídeos, uréia, creatinina, ALT e AST; **Resultados:** O tratamento com o extrato em ratos diabéticos apresentou: ganho de 5% (p<0,001) do peso corporal perdido no período de instalação do diabetes; redução de 39% (p<0,001) da glicemia de jejum; redução de 100% (p<0,05) do aumento da hemoglobina glicada quando comparado a ratos diabéticos tratados com salina; redução de 66% (p<0,001) e 66% (p<0,001) nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e VLDL; redução de 35% (p<0,01) dos níveis plasmáticos de ureia; diminuição (p<0,05) de 10% da pressão arterial sistólica quando comparado a ratos diabéticos tratados com salina. Com relação aos ratos não diabéticos o tratamento com o extrato apresentou: diminuição (p<0,05) de 38% do colesterol total e (p<0,05) de 44% do LDL, diminuição da frequência cardíaca (p<0,05) de 13%, revelou ainda, o potencial anti-hiperglicemiante do extrato após sobrecarga de glicose, uma vez que os animais não diabéticos tratados com salina apresentaram aumentos de (p<0,001) de 29% (30 min), (p<0,001) de 37% (60 min), (p<0,001) de 32% (90 min), (p<0,001) de 31% (120 min), (p< 0,01) de 29% (150 min) e (p<0,001) de 40% (240 min) de glicemia; **Conclusão:** O extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *T. catappa* tem efeito antidiabético, antiglicante, hipotriglicerolêmico e protetor renal em ratos diabéticos.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*. Aloxana. Plantas medicinais. *Terminalia catappa*.

ABSTRACT

Introduction: *Diabetes mellitus* is a chronic metabolic disorder that is associated hyperglycemia inappropriate to changes in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. Is related to high rates of mortality due to chronic complications in the long term. Based on these assumptions, there is great interest in the scientific community in medicinal plants such as *Terminalia catappa*, used as adjuncts in the treatment of diabetes. In order to enable the inclusion of these plants in the public health system and the knowledge of its chemical constituents as possible prototypes new antidiabetic drugs. Given this, it became the goal of this study was to evaluate the antidiabetic effect of hydroalcoholic extract of the stem bark of *T. catappa* in rats;

Methods: Rats were randomized into four groups, non-diabético saline (CS), non-diabetic extract (CE), diabetic saline (DS) and diabetic extract (DE), n = 10. Diabetes was induced by alloxan (40 mg / Kg, iv), after 15 days were considered diabetic rats with fasting blood glucose above 200 mg / dL. At this time, the animals were divided (n = 5), half of the rats in each group, for the test oral glucose tolerance and the other for the treatment with the extract for 15 days (200 mg / Kg, po). The animals were weighed throughout the experimental protocol. At the end of treatment were carried out direct measurements of blood pressure and heart rate in anesthetized rats and then were euthanized under anesthesia and blood was collected to perform the measurements of plasma glucose, glycated hemoglobin, lipids, urea, creatinine, AST and ALT;

Results: The treatment with the extract in diabetic mice showed: gain of 5% (p <0.001) of body weight lost induction of diabetes start of treatment; 39% reduction (p <0.001) fasting glycemia; 100% reduction (p <0.05) increased glycated hemoglobin compared to diabetic rats treated with saline; 66% reduction (p <0.001) and 66% (p <0.001) in plasma levels of VLDL triglicerideos and; 35% reduction (p <0.01) in plasma urea; decrease (p <0.05) by 10% in systolic blood pressure when compared to diabetic rats treated with saline. In relation to the non-diabetic mice treated with the extract showed: decrease (p <0.05) by 38% and total cholesterol (p <0.05) 44% of LDL, decreases in heart rate (p <0, 05) 13%, still revealed the potential antihyperglycaemic extract after glucose load, since the non-diabetic animals treated with saline showed increases (p <0.001) 29% (30 min) (p < 0.001) 37% (60 min) (p <0.001) 32% (90 min) (p <0.001) 31% (120 min) (p <0.01) 29% (150 min) and (p <0.001) 40% (240 min) glucose;

Conclusion: The hydroalcoholic extract of the stem bark of *T. catappa* has antidiabetic effect, antiglicante, hipotriglicerolêmico protector and kidney in diabetic rats.

Keywords: *Diabetes mellitus*. Alloxan. Medicinal plants. *Terminalia catappa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Regulação fisiológica da liberação de insulina pelas células β do pâncreas	15
Figura 2 – As vias de sinalização da insulina	16
Figura 3 – <i>Terminalia catappa</i> (a), detalhe das folhas (b)	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Hemoglobina glicada (%) dos ratos no fim do tratamento com o extrato	46
Gráfico 2 – Efeito do tratamento agudo com o extrato sobre o teste de tolerância oral a glicose	46
Gráfico 3 – Ureia plasmática dos ratos no fim do tratamento com o extrato	48
Gráfico 4 – Creatinina plasmática dos ratos no fim do tratamento com o extrato	48
Gráfico 5 – Alanina amino transferase plasmática dos ratos no fim do tratamento com o extrato.....	49
Gráfico 6 – Aspartato amino transferase plasmática dos ratos no fim do tratamento com o extrato.....	49
Gráfico 7 – Parâmetros hemodinâmicos dos ratos no fim do tratamento com o extrato	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Prospecção química do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de <i>Terminalia catappa</i>	44
Tabela 2 – Peso corporal (g) dos ratos durante o experimento.....	44
Tabela 3 – Glicose plasmática em jejum (mg/dL) dos ratos no início e fim do tratamento com o extrato	45
Tabela 4 – Perfil lipídico dos ratos no fim do tratamento com o extrato	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Homeostasia energética	14
2.2 <i>Diabetes mellitus</i>	20
2.3 Diabetes experimental	24
2.4 Plantas medicinais hipoglicemiantes e <i>Terminalia catappa</i>	29
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4 MATERIAL	38
4.1 Material botânico: cascas do caule de <i>Terminalia catappa</i>	38
4.2 Animais	38
4.3 Substâncias	38
5 MÉTODOS	39
5.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule de <i>Terminalia catappa</i>	39
5.2 Prospecção química	39
5.3 Indução do diabetes	39
5.4 Delineamento experimental	39
5.5 Peso dos animais	40
5.6 Perfil glicídico	40
5.6.1 Glicemia de jejum	40
5.6.2 Hemoglobina glicada.....	40
5.6.3 Teste de tolerância oral a glicose.....	41
5.7 Perfil lipídico	41
5.7.1 Colesterol total	41
5.7.2 Colesterol HDL.....	41
5.7.3 Colesterol LDL.....	42
5.7.4 Triglicérides	42
5.7.5 Colesterol VLDL	42
5.8 Marcadores de lesão renal	43

5.8.1 Ureia.....	43
5.8.2 Creatinina	43
5.9 Marcadores de lesão hepática	43
5.9.1 Alanina amino transferase	43
5.9.2 Aspartato amino transferase	43
5.10 Parâmetros hemodinâmicos	44
5.11 Análise estatística	44
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Classes de produtos naturais identificados na prospecção química do extrato	45
6.2 Efeito do tratamento com o extrato sobre o peso corporal dos ratos.....	45
6.3 Efeito do tratamento com o extrato sobre o perfil glicídico	46
6.3.1 Glicose plasmática	46
6.3.2 Hemoglobina glicada.....	46
6.3.3 Teste de tolerância oral a glicose.....	47
6.4 Efeito do tratamento com o extrato sobre o perfil lipídico	48
6.5 Efeito do tratamento com o extrato sobre os marcadores de lesão renal ...	48
6.6 Efeito do tratamento com o extrato sobre os marcadores de lesão hepática	50
6.7 Efeito do tratamento com o extrato sobre os parâmetros hemodinâmicos.	51
7 DISCUSSÃO	53
8 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM) é um transtorno metabólico que pode ser caracterizado por hiperglicemia inapropriada. Trata-se de uma patologia crônica que está associada à deficiência parcial ou total da secreção de insulina e/ou de sua ação. Os aspectos de suas manifestações clínicas estão relacionados ao distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e as complicações ao longo do tempo (SBD, 2009).

No distúrbio metabólico a hiperglicemia é resultado do aumento de produção de glicose pelo fígado e/ou da diminuição da remoção da glicose do sangue. Além disso, apresenta as características de perda de peso, polidipsia, polifagia, poliúria, glicosúria e cetonúria. Quanto às complicações crônicas, o DM está relacionado à alta morbimortalidade, por causar inúmeros danos, desde disfunções até a falência de vários órgãos, a partir de alterações na macro e microvasculatura. Essas alterações são responsáveis pelo desenvolvimento de neuropatia, retinopatia, nefropatia, macroangiopatias e cardiopatia diabética. Diante disso, a doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte entre estes pacientes (ADA, 2012).

Em busca de controlar a hiperglicemia e de retardar o desenvolvimento de complicações crônicas a terapêutica farmacológica faz uso de insulina exógena e de fármacos hipoglicemiantes orais segundo um esquema terapêutico que visa poupar ao máximo as células β pancreáticas ainda funcionais. Entretanto, mesmo diante desses esforços a normoglicemia raramente é alcançada. Dessa forma, tem sido incentivada a pesquisa de novas drogas eficazes no tratamento do DM ou de terapêuticas coadjuvantes que alcancem o objetivo da normoglicemia, e ainda com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre a fisiopatologia do DM (SBD, 2007; SHU, 2009).

A fim de alcançar esse objetivo vários modelos experimentais em animais têm sido desenvolvidos. Um dos mais utilizados é a indução química do DM através da administração de aloxana em ratos. Resultando em insuficiência insulínica seguida do estabelecimento de diabetes permanente, que reproduz os sintomas clínicos, laboratoriais e histológicos do DM em humanos (LERCO et al., 2003).

Diante da necessidade de novas terapias no tratamento do DM, da ferramenta experimental disponível e da vasta flora brasileira. As plantas medicinais se

tornaram alvo de pesquisas, com o objetivo a incluir essas plantas nas políticas públicas de saúde e do uso de seus constituintes químicos ativos como protótipos para novos agentes hipoglicemiantes.

Os mecanismos de ação a partir dos quais as plantas medicinais diminuem a glicemia sanguínea podem ser: aumento do número e/ou da sensibilidade dos receptores para a insulina, aumento da resistência aos hormônios que aumentam a glicemia e aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos. Isto pode promover aumento da liberação de insulina pancreática, diminuição da perda de glicogênio, eliminação de radicais livres, resistência à peroxidação lipídica e melhora da desordem metabólica sobre lipídeos e proteínas (MARLES FARNSWORTH, 1995; SAID et al., 2002; VOLPATO; DAMASCENO; CALDERON, 2002).

Dentre os vários gêneros de importância medicinal para o diabetes, o gênero *Terminalia* vem despertando o interesse da comunidade científica. Em várias partes do mundo estudos com diferentes espécies do gênero vêm afirmando seu potencial no tratamento do DM. Entre estas espécies estão *Terminalia pallida* (RAO et al., 2003), *T. bellirica* (SABU; KUTTAN, 2009; KASABRI; FLATT; ABDEL-WAHAB, 2010), *T. chebula* e *T. catappa* (AHMED et al., 2005; NAGAPPA et al., 2003).

A *T. catappa* está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, e a população relata seu uso para o tratamento de distúrbios intestinais, hepáticos e no diabetes. Além disso, a literatura relata que o extrato aquoso das folhas apresenta atividade antidiabética em ratos (AHMED et al., 2005) e o extrato dos frutos diminui os níveis de glicose no soro sanguíneo de ratos induzidos por aloxana (NAGAPPA et al., 2003). Até o momento não existem estudos na literatura sobre o potencial antidiabético, anti-hiperglicemiante, os efeitos metabólicos e parâmetros hemodinâmicos de ratos diabéticos após tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico das cascas do caule da *T. catappa*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Homeostasia energética

A capacidade de armazenar nutrientes e de liberá-los na circulação sanguínea, quando necessários, é uma característica que tem permitido a continuidade da vida sem que seja obrigatória a ingestão contínua de nutrientes. O metabolismo energético é controlado especialmente pelos tecidos encefálico, hepático, muscular e adiposo através da atuação do sistema nervoso, das variações entre os hormônios insulina, glucagon e catecolaminas e de conjuntos enzimáticos pertencentes a esses tecidos (SHU et al., 2009).

Em situações fisiológicas, após uma refeição, o estado absorptivo tem duração de duas a quatro horas, nesse período haverá aumento dos níveis plasmáticos de glicose, aminoácidos e triacilgliceróis. O metabolismo de carboidratos começa por sua digestão na boca, com a ação mecânica de dentes, demais componentes da cavidade oral e com a ação enzimática da amilase salivar presente na secreção das glândulas salivares. No percurso pelo trato gastrintestinal (TGI), polissacarídeos como o amido sofrem ainda a ação da amilase pancreática, que, de forma semelhante à amilase salivar, tem capacidade de clivagem dessas macromoléculas em oligossacarídeos e dissacarídeos. Por fim, no epitélio absorptivo do intestino delgado, em sua porção do jejuno, existe uma classe de enzimas chamadas α -glicosidases (como exemplos: maltase, lactase e isomaltase) que têm função de clivar esses carboidratos intermediários em monossacarídeos que podem assim, ser absorvidos (ENGLYST; ENGLYST, 2005; BARRETT; UDANI, 2011).

A glicose, principal substrato energético das células eucarióticas, é uma molécula polar que não é solúvel na bicamada lipídica da membrana plasmática celular, dessa forma, ela precisa ser transportada por proteínas carreadoras. Essas proteínas são conhecidas por transportadores de glicose e estão divididos em duas famílias: os transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e os cotransportadores de sódio/glicose (SGLTs). Após a digestão dos carboidratos, a absorção da glicose no epitélio intestinal é realizada através do co-transportador de sódio/glicose SGLT1. Esse é codificado pelo gene SLC5A1 e apresenta 14 segmentos transmembrana hidrofóbicos. Sua ação ocorre pelo transporte de dois íons Na^+ para cada molécula de glicose, através de transporte ativo secundário.

Esse transporte é determinado pelo gradiente de concentração de Na^+ e pelo potencial da membrana, dependente de Na^+/K^+ -ATPase (WRIGHT; TURK, 2004; SABINO-SILVA et al., 2010).

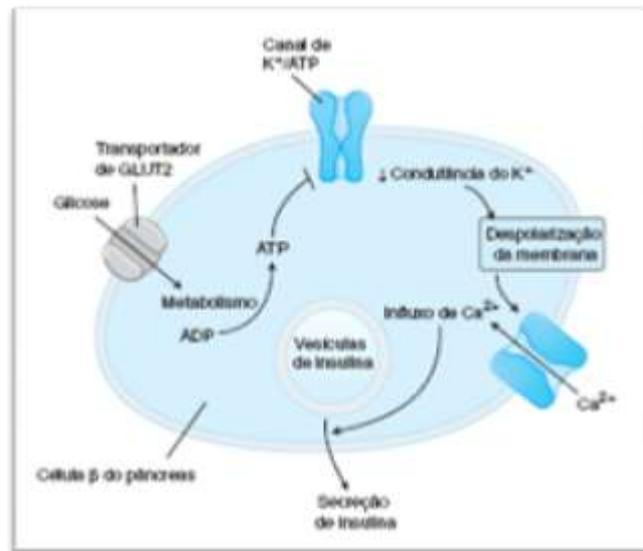
De uma forma mais detalhada, quando os dois íons Na^+ se ligam ao SGLT1, induzem uma alteração conformacional que aumenta a afinidade da molécula à glicose. Após a ligação da glicose ao SGLT1, ocorre uma nova alteração conformacional que resulta na reorientação dos sítios de ligação do Na^+ e da glicose para o meio intracelular, a glicose é liberada e em seguida os dois íons Na^+ . O SGLT1 retorna ao seu estado conformacional inicial, possibilitando o início de novo ciclo. Em acréscimo, a molécula de glicose carrega consigo 264 moléculas de água, sendo esse um importante mecanismo na absorção de água nos enterócitos (ARAÚJO; MARTEL, 2009).

Após a glicose ser transportada para dentro do enterócito pelo SGLT1 ocorre a translocação de transportadores GLUT2 de vesículas intracelulares para a membrana basal mediada por altas concentrações de Ca^{2+} intracelular que ativam a via da proteína cinase C (PKC). O transporte de glicose do enterócito para a corrente sanguínea através de GLUT2 é mediado por transporte facilitado. Esse mecanismo leva ao aumento da concentração de glicose plasmática no período pós-prandial (ARAÚJO; MARTEL, 2009).

A célula β pancreática em repouso apresenta sua membrana plasmática hiperpolarizada e sua despolarização culmina na secreção de insulina, da seguinte forma: quando a concentração de glicose plasmática está elevada, como após uma refeição, a glicose entra na célula β através do transportador de glicose GLUT2, por difusão facilitada através do gradiente de concentração. Em meio intracelular, a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato pela enzima glicocinase (hexocinase). De uma forma sequencial, glicose-6-fosfato entra na via metabólica da glicólise que viabiliza a formação de ATP e piruvato. O piruvato é transportado através das membranas mitocondriais e na matriz mitocondrial é convertido em Acetil-CoA que entra no Ciclo de Krebs para a formação de mais ATP e de transportadores de elétrons NADH e FADH_2 , os quais se deslocam para a membrana interna mitocondrial, onde cedem seus elétrons para a cadeia fosforilativa de elétrons culminando assim, na formação de grandes concentrações de ATP intracelular. As altas concentrações de ATP intracelular inibem o canal para K^+ sensível a ATP, dessa forma ocorre diminuição da condutância ao K^+ , ativando canais para

Ca^{2+} sensíveis a voltagem. Por conseguinte, o Ca^{2+} intracelular age como secretagogo de insulina. Dessa forma, esta despolarização celular promove a secreção das vesículas contendo insulina como está representado na figura 1 (SEINO; SHIBASAKI; MINAMI, 2011; ZHENG et al., 2012).

Figura 1 – Regulação fisiológica da liberação de insulina pelas células β do pâncreas.



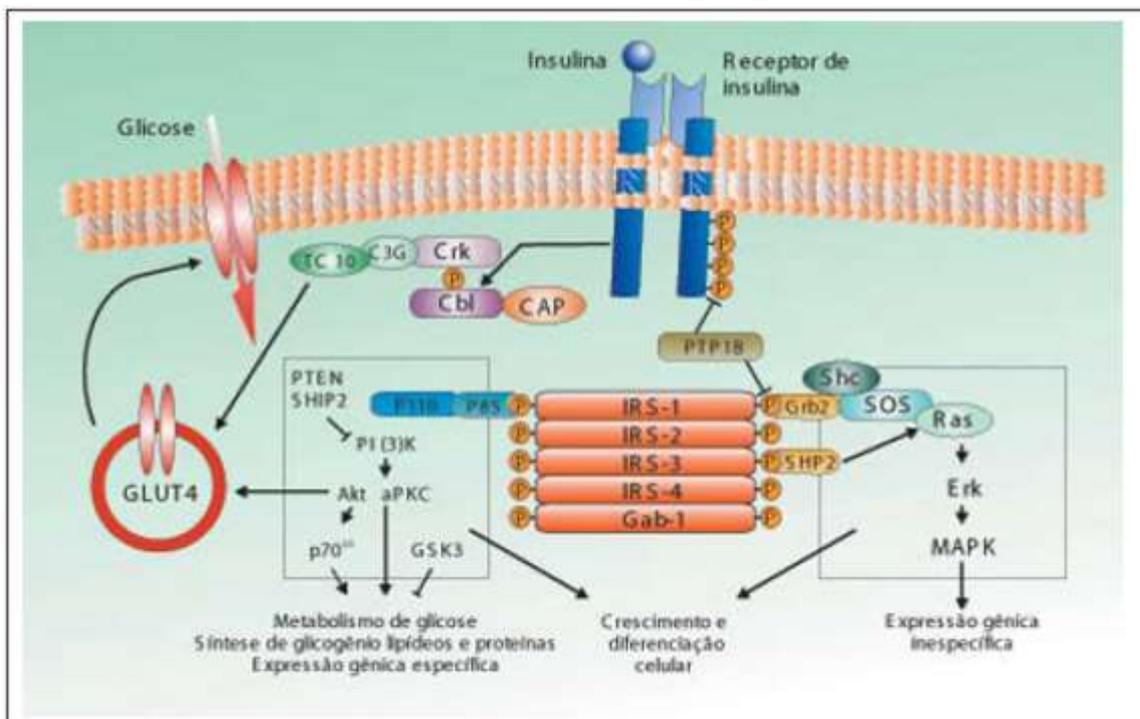
Fonte: SHU et al., 2009.

A secreção de insulina é um processo que tem o objetivo de viabilizar concentrações estáveis de glicose nos períodos de jejum e também após a alimentação. Portanto, a glicose é o principal estímulo a liberação de insulina, além disso, as células β pancreáticas apresentam atividade da glicocinase, enzima que fosforila a glicose de forma proporcional a sua concentração sanguínea. A secreção de insulina é regulada ainda pela ingestão de aminoácidos e pela secreção de hormônios intestinais como o peptídeo inibidor gastrointestinal (GIP), peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), secretina, gastrina e colecistocinina. De maneira distinta, a inibição da secreção de insulina ocorre na escassez de substrato energético proveniente da dieta, no estímulo a secreção de glucagon e na secreção de adrenalina (SEINO; SHIBASAKI; MINAMI, 2011). Uma vez que as ilhotas de Langerhans são inervadas por nervos adrenérgicos e colinérgicos, qualquer estímulo que ative o ramo simpático inibe a secreção de insulina por estimular receptores α_2 adrenérgicos (DAVIS, 2007).

O receptor para insulina é uma proteína transmembranar composta por quatro subunidades unidas por ligações dissulfetos (duas subunidades α externas a

membrana, onde está o sítio de ligação da insulina e duas subunidades β internas a membrana com atividade tirosina proteinocinase). O mecanismo de ação da insulina, ilustrado na figura 2, envolve sua ligação a receptores específicos localizados na membrana plasmática de tecidos-alvo como o hepático, muscular e adiposo, mas também de tecidos não-avlos. Uma vez que todas as células apresentam receptores para a insulina, essa diferenciação entre os tecidos se dá pela variação extrema no número desses receptores por tipo de célula. Quando a insulina se liga às subunidades α , as subunidades β se tornam autofosforiladas e ativam tirosinocinase que, por sua vez, fosforila outras enzimas intracelulares incluindo o grupo de substratos do receptor de insulina (IRS). Existem diferentes tipo de IRS (IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4), outros substratos incluem Shc, Gab-1, $p60^{\text{dok}}$, Cbl, JAK2 e APS que são expressos em diferentes tecidos e, dessa forma, vão permitir a insulina diversas ações, durante diferentes tempos de atuação, em minutos, horas ou até mesmo dias (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Figura 2 – As vias de sinalização da insulina.



Fonte: CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002.

Após a ligação da insulina ao seu receptor esse complexo é internalizado, uma vez dentro da célula a insulina é digerida nos lisossomos citoplasmáticos. Os

receptores podem ser também degradados ou reciclados sendo novamente deslocados para a membrana celular, no entanto, quando os níveis de insulina estão muito elevados é favorecida a degradação desses receptores, diminuindo assim seu número na membrana celular e levando a subsensibilização (DAVIS, 2007)

No período absorptivo, após uma refeição, praticamente todos os tecidos utilizam glicose como fonte de energia e a resposta metabólica corporal a esse estado é caracterizada por alterações no metabolismo dos tecidos hepático, adiposo, muscular e encefálico. O fígado recebe a drenagem venosa intestinal e pancreática, então após uma refeição é banhado com os nutrientes absorvidos e a insulina secretada, sendo assim, ele capta a maioria dos carboidratos, lipídeos e aminoácidos que são então, metabolizados, armazenados ou encaminhados a outros tecidos (MARTINS, 2006).

No fígado os carboidratos aumentam a fosforilação de glicose, através de transportadores GLUT2 e pela ação da glicocinase produz glicose-6-fosfato, conseqüentemente também é aumentada a síntese de glicogênio, por ativação da glicogênio-sintase. Ocorre ainda aumento da via das pentoses e da glicólise, onde a formação de grandes concentrações de Acetil-CoA viabilizam não só a síntese de ATP, mas também de ácidos graxos.

Quando o aporte de carboidratos da dieta é superior a necessidade energética, ocorre aumento da síntese de ácidos graxos pela ativação da Acetil-CoA-carboxilase e excesso de seus substratos, viabiliza ainda o aumento da síntese de triacilgliceróis, uma vez que o acil-CoA graxo está disponível (oriundo do Acetil-CoA formado na glicólise e da hidrólise dos triacilgliceróis componentes do quilomícron). Além disso, o fígado compacta triacilgliceróis na forma de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), essas são secretadas no sangue e utilizadas por outros tecidos como adiposo e muscular (RADER, 2002).

O tecido adiposo também apresenta a capacidade de distribuir moléculas energéticas. A ação da insulina em curto prazo em tecidos-alvo, como o adiposo e o muscular, é devido transportador de glicose GLUT4. Trata-se de um transportador de glicose sensível a insulina que tem a principal função proporcionar a captação de glicose. Quando a célula está em repouso, GLUT4 se localiza em meio intracelular, no entanto, quando ocorre o estímulo insulínico nas células desses tecidos é determinada sua movimentação e conseqüente translocação em direção à membrana plasmática, proporcionando a captação de glicose e contribuindo para a

homeostasia glicêmica em nível tecidual e plasmático (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006).

Dessa forma, no tecido adiposo, altos níveis de glicose e insulina favorecem a síntese de triacilgliceróis, uma vez que o aumento intracelular de glicose via GLUT4 estimula a glicólise e essa viabiliza a síntese de glicerol-fosfato (adipócitos não possuem glicerol-cinase). Em acréscimo, após uma refeição contendo lipídeos, ácidos graxos são fornecidos ao tecido adiposo através da hidrólise de triacilgliceróis do quilomícron e do VLDL vindo do fígado. Esses ácidos graxos exógenos são liberados pela ação da enzimática da lipase lipoprotéica presente nos capilares do tecido adiposo e muscular, resultando em síntese e armazenamento de triacilgliceróis. Além disso, altos níveis de insulina ainda impedem a degradação de triacilgliceróis por inativar a lipase sensível a hormônio (RADER, 2002).

No tecido muscular, o transporte de glicose é dependente da ação da insulina e mediado por transportadores GLUT4, como mencionado anteriormente, em meio intracelular a glicose é fosforilada a glicose-6-fosfato e metabolizada a fim de ser formado ATP, essencial a contração muscular. Ademais, a síntese de glicogênio é ativada para que seja usado como reserva de energia. Quanto ao metabolismo de proteínas, após uma refeição, o tecido muscular estimula a síntese de proteínas a fim de repor proteínas degradadas (MARTINS, 2006).

De maneira distinta, no jejum, os níveis plasmáticos de nutrientes diminuem e conseqüentemente há diminuição da secreção de insulina e aumento da secreção de glucagon pelas células α das ilhotas pancreáticas e de catecolaminas pela supra-renal. Logo, diante da privação de nutrientes há o início de um período catabólico, havendo trocas de substratos entre os tecidos com o objetivo de manter os níveis plasmáticos normais de glicose, para que o metabolismo encefálico não seja comprometido e de mobilizar ácidos graxos do tecido adiposo e corpos cetônicos do fígado para suprir as necessidades energéticas de todos os outros tecidos. Para tal, o fígado degrada glicogênio e inicia a gliconeogênese e oxida ácidos graxos para formar Acetil-CoA. O tecido adiposo degrada triacilgliceróis para fornecer ácidos graxos e glicerol ao fígado, ocorre proteólise muscular para que os aminoácidos sejam catabolizados para a gliconeogênese hepática e o encéfalo passa a usar, além de glicose, corpos cetônicos como combustíveis energéticos (GOORDAZI et al., 2011)

A compreensão de todos os componentes envolvidos na homeostasia energética se mostra imprescindível ao completo entendimento dos mecanismos e componentes envolvidos na fisiopatologia do *diabetes mellitus* e das demais alterações de ordem metabólica.

2.2 Diabetes mellitus

O *Diabetes Mellitus* (DM) é um transtorno metabólico que têm como principal característica clínica hiperglicemia inapropriada. Trata-se de uma patologia crônica que está associada à deficiência parcial ou total da secreção de insulina e/ou de sua ação (SBD, 2009). Ocorrem ainda, alterações no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos, dessa forma, sendo considerada uma síndrome de etiologia múltipla. Relaciona-se diretamente a inúmeras complicações crônicas específicas que podem culminar em danos ou falência de vários órgãos como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (BERTOLUCI et al., 2008; TABIT et al., 2010).

O DM é classificado por sua etiologia em quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional. Além dessas, existem a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, que são mencionadas como categorias pré-diabetes, não são classes clínicas, no entanto, trata-se de pontos críticos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e do DM (ADA, 2012; SBD, 2009).

O DM tipo 1 representa aproximadamente 10% dos pacientes diabéticos e se caracteriza pela destruição auto-imune das células β do pâncreas que culmina em total deficiência de insulina. As ilhotas de Langerhans são infiltradas por linfócitos T ativados causando insulite e essa destruição acontece numa taxa variável, pode ser rápida como em crianças ou lenta, forma mais comumente observada em adultos. O aparecimento da sintomatologia acontece quando a destruição das células β é de 80 a 90% (ADA, 2012).

Em geral, o início do DM tipo 1 acontece na infância ou puberdade e a sintomatologia aparece de forma abrupta, caracterizada por poliúria, polidipsia e polifagia, tais sintomas são acompanhados por fadiga, perda de peso e fraqueza. As alterações metabólicas são oriundas da deficiência de insulina associada ao excesso de glucagon. As alterações mais marcantes são sobre o metabolismo dos tecidos hepático, adiposo e muscular. A hiperglicemia ocorre por aumento da

produção de glicose hepática e por diminuição da utilização periférica de glicose, devido à incapacidade dessas células de captarem glicose, uma vez que não há estímulo insulínico para a translocação do GLUT4 (ADA, 2012; MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006)

A cetoacidose diabética é resultado da mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, vinculada a síntese hepática de 3-hidroxiacetato e acetoacetato. O excesso de ácidos graxos que não é usado na síntese de corpos cetônicos é convertido em triacilgliceróis que são compactados e secretados na forma de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade). Além disso, devido aos baixos níveis de insulina, a síntese da lipase lipoprotéica está diminuída (enzima responsável por degradar lipoproteínas no tecido adiposo), conseqüentemente os níveis de quilomícron e VLDL no plasma ficam elevados o que resulta em hipertriacilglicerolemia (STOJANOVIC; ILHE, 2011)

Por redução das células β pancreáticas funcionais, os pacientes diabéticos tipo 1, se tornam dependentes do tratamento com insulina exógena, administrada por via subcutânea, para que seja controlada a glicemia e a cetoacidose. A administração da insulina é determinada a depender dos níveis médios de glicose sanguínea e do percentual de hemoglobina glicada (HbA1c) (SBD, 2009).

A HbA1c é a denominação aos produtos das reações entre a hemoglobina normal (HbA) e alguns açúcares. A HbA1c revela o nível glicêmico médio dos três meses anteriores a realização do teste, assim permite a avaliação do controle da glicemia e a eficiência do tratamento que está sendo realizado. Numa análise laboratorial, indivíduos normais apresentam 3 a 6% de HbA1c, já em pacientes diabéticos mal controlados pode alcançar até 20%. Níveis superiores a 7% implicam em complicações crônicas, sendo definido como o limite superior, a partir dele, existe o risco de retinopatia, nefropatia, neuropatia e microalbuminúria. A Sociedade Brasileira de Diabetes adotou o nível de 6,5% de HbA1c como meta para o controle glicêmico. No entanto, é recomendada a manutenção desses níveis menores possíveis, mas sem riscos de hipoglicemia (BEM; KUNDE, 2006; SBD, 2009; MALKANI; MORDES, 2011).

Em pacientes com DM tipo 2, além dos parâmetros avaliados de glicemia de jejum e HbA1c, também é realizado o teste de tolerância oral a glicose. Nesse teste, após um período de jejum é administrada por via oral uma sobrecarga de glicose, 75 g, em seguida, são realizadas dosagens de glicemia em função do tempo, a partir

disso, pode ser avaliado o metabolismo glicídicos e a resistência a insulina a depender do tempo que a glicose demora a ser retirada da corrente sanguínea. Em pacientes com DM tipo1, não é um teste recomendado, uma vez que esses pacientes não apresentam células β pancreáticas funcionais (SBD, 2007).

O principal objetivo do tratamento do DM tipo 1 é a normoglicemia. Além disso, objetiva-se minimizar o desenvolvimento das complicações crônicas. No entanto, episódios de hipoglicemia são frequentes nesses pacientes e são revertidos pela secreção dos hormônios contra-reguladores (glucagon e adrenalina). Algum tempo após a instalação do DM, o paciente desenvolve também deficiência na secreção de glucagon, então somente a adrenalina passa compensar os efeitos hipoglicêmicos da insulina exógena. Diante disso, a progressão do DM leva a neuropatia diabética e resulta em diminuição da secreção de adrenalina, por conseguinte, o paciente passa por quadros de hipoglicemia despercebida (RORSMAN; BRAUN; ZHANG, 2011)

O DM tipo 2 é a forma mais abrangente de diabetes (85-90%), pode ocorrer em todas as idades, entretanto acomete mais pessoas após os 40 anos. Cerca de 85 % dos pacientes são obesos e 92% possuem resistência periférica à insulina endógena, isso acrescido de uma distribuição anormal de gorduras, com maior acúmulo de gordura acima da cintura (ADA, 2012).

Nesses pacientes ocorre uma associação entre resistência à insulina (RI) e disfunção das células β , determinada por fatores genéticos. A RI é a redução da atividade da insulina na captação de glicose pelas células-alvo. Os fatores que podem determinar a RI são: menor atividade dos receptores de insulina, considerando-se que o número de receptores é regulado pela concentração de insulina, a hiperinsulinemia acarreta a diminuição do número de receptores; alterações na estrutura da insulina e em sua afinidade de ligação pelo receptor (SCOBIE, 2007) deficiência no transporte de insulina para o interior das células, já que a insulina é responsável por determinar a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática nos tecidos dependentes de insulina (STÖCKLI; FAZAKERLEY; JAMES, 2011).

No tratamento do DM tipo 2, a terapia de primeira escolha associa mudanças no estilo de vida do paciente com o estabelecimento de uma dieta, a partir de orientação nutricional e atividades físicas. Tais ações promovem melhora da sensibilidade à insulina o que é observado pela diminuição dos níveis de glicose

plasmática, devido à redução da circunferência abdominal, gordura visceral e melhora do perfil metabólico lipídico (SBD, 2009).

Com o objetivo de controlar a glicemia e de diminuir a HbA1c nos pacientes em que o tratamento não farmacológico não consegue atuar sozinho é incorporado o tratamento farmacológico. Sendo assim, o tratamento tem como objeto a normoglicemia e sua manutenção em longo prazo, a fim de evitar a evolução de mecanismos de resistência a insulina, falência progressiva das células β , transtornos metabólicos e vasculares (MARTINS, 2006).

Quanto ao tratamento farmacológico são empregados os agentes hipoglicemiantes orais, substâncias que têm a finalidade de baixar a glicemia e mantê-la normal. Podem ser classificados em agentes que aumentam a secreção pancreática de insulina (sulfoniluréias e meglitinidas), os que reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das α -glicosidases), os que diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas), os que aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas) e os que aumentam a secreção de insulina apenas no estado de hiperglicemia (tiazolidinedionas) (SBD, 2007; SHU, 2009).

De uma maneira geral tanto no DM tipo 1, quanto no DM tipo 2 estão estreitamente relacionados à alta morbimortalidade, devido as complicações crônicas, sendo a doença cardiovascular (DCV) a principal causa de morte entre estes pacientes. Pacientes diabéticos têm maior propensão a morrer por doença cardíaca, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral. Tais complicações vasculares compreendem microangiopatias (enfermidades de pequenos vasos que se manifestam como nefropatias, neuropatias e retinopatias) e macroangiopatias (disfunção aterosclerótica de grandes vasos como coronárias, carótidas e periféricas em membros inferiores) resultando em cardiopatias isquêmicas, acidente vascular cerebral e doenças vasculares periféricas (KANTERS et al., 1999; ADDISON; AGUILAR, 2011)

Vários mecanismos têm sido propostos por associar disfunção endotelial à hiperglicemia, como: aumento da atividade da via dos polióis (BARREIROS; BOSSOLAN; TRINDADE, 2005; RAMANA, 2012), formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs) (MÉNDEZ, 2003; PADDU et al., 2012), estresse oxidativo (PONUGOTI; DONG; GRAVES, 2012) e alterações na proteína cinase C (LI et al., 2012).

A disfunção endotelial (DE) se dá a partir da perda das propriedades do endotélio, por alterações na síntese de proteínas, aumento do tônus e da permeabilidade vascular e pelo desenvolvimento de atividade pró-trombótica e antifibrinolítica. Tais efeitos ocorrem pela diminuição da liberação de óxido nítrico (NO) e dos demais fatores vasodilatadores, ocorrendo aumento da liberação de fatores vasoconstrictores. Diante disso, é modificado o perfil fisiológico antiaterogênico e desenvolvido um perfil com proliferação de células musculares lisas, agregação plaquetária, oxidação de LDL, adesão de monócitos e plaquetas e a síntese de citocinas inflamatórias culminando em processo aterogênico (TABIT et al., 2010).

No DM tipo 1, a função endotelial é regulada pelo grau de hiperglicemia, o tempo de duração do DM, pelas concentrações séricas de insulina e pela presença de neuropatia diabética. No estado diabético estão presentes vários mecanismos como a vasodilatação modulada pela insulina, cujos níveis flutuam amplamente nos diabéticos insulino-dependentes, a hiperglicemia que altera as respostas vasculares e, quanto maior a duração, leva à formação dos AGEs que alteram a liberação do NO e as alterações da função do sistema nervoso autônomo, que regula o tônus e a reatividade vascular, que podem estar presentes mesmo na falta de evidência clínica de neuropatia (TABIT et al., 2010).

Por fim, o DM afeta a vida do paciente em todas as suas vertentes, causando dor, ansiedade, perda da qualidade de vida, além do impacto financeiro, além de ser uma das principais causas de cegueira, doença renal em estágio final, doença miocárdica silenciosa, amputação de membros e morte por acidentes cardiovasculares (SBD, 2009).

Diante dessas premissas, tornou-se indispensável um melhor conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos do DM e de suas complicações, além dos novos tratamentos capazes de se opor as alterações endócrinas, metabólicas e funcionais causadas pela doença. Por conseguinte, vários grupos de pesquisa vêm utilizando diversos modelos experimentais com essa finalidade.

2.3 Diabetes experimental

Modelos experimentais de DM em animais têm sido usados, a fim de melhor conhecer a fisiopatologia do diabetes, de desenvolver novos fármacos e técnicas de

transplante de pâncreas, podendo a partir disso, obter melhoras para a saúde do diabético.

O DM experimental pode ser induzido através de mecanismos de indução farmacológica, cirúrgica ou manipulações genéticas de espécies animais como: cachorros, coelhos, ratos e camundongos (LERCO et al., 2003). Existem espécies animais que desenvolvem espontaneamente DM insulino-dependente (Hamster Chino, o coelho Branco da Nova Zelândia e o cachorro Keshond), no entanto, não apresentam características semelhantes o suficiente para serem comparados com o DM tipo 1 humano (HERNANDORENA; GONZALES; GARCIA, 2001). Entretanto, os ratos BB (*Biobreading*) e os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) são dois excelentes modelos para comparação com DM tipo 1 humano (LEITER; HERRATH, 2004; DELARCHE, 2001; ATKINSON; LEITER, 1999).

Nos ratos BB, os sintomas aparecem no terceiro mês de idade e apresentam manifestações que incluem hipoinsulinemia, hiperglicemia, glicosúria, perda de peso, polidipsia, poliúria e cetoacidose. A manipulação da predisposição genética destes animais e o cruzamento entre linhagens distintas resultam numa imunopatogênese que tem demonstrado a importância das células T no processo da doença, assim como, os diferentes caminhos na manipulação do sistema imune para a prevenção do diabetes (HERNANDORENA; GONZALES; GARCIA, 2001).

Quanto aos camundongos NOD, modelo mais estudado de doença espontânea auto-imune órgão-específico, apresentam genoma bem definido, maior quantidade de reagentes monoclonais para a análise de componentes do sistema imune e um custo razoavelmente baixo, comparado com a utilização de ratos. Estes animais desenvolvem insulite, o início do diabetes é marcado por glicosúria moderada e glicemia maior que 250 mg/dL, apresentam-se hipoinsulinêmicos e hiper glucagonêmicos, confirmando a destruição seletiva das células beta pancreáticas (GROSS, 2001; LEITER; HERRATH, 2004).

Além dos animais que desenvolvem espontaneamente DM, a indução química do diabetes também é muito empregada, uma vez que promovem destruição química seletiva das células β pancreáticas. As substâncias mais utilizadas para esta indução em ratos, camundongos e coelhos são aloxana e estreptozotocina. Ambos os fármacos exercem as suas ações diabetogênicas quando administrados pelas vias intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose necessária à indução

do diabetes depende da espécie animal avaliada, via de administração e do estado nutricional (LERCO et al., 2003; SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008).

Em 1838 Wohler e Liebig sintetizaram um derivado da pirimidina, que posteriormente foi denominado aloxana (*apoud* LENZEM, 2008). Em 1943, Dunn, Sheehan e McLetchie afirmaram que se tratava de uma droga capaz de induzir diabetes em coelhos por causar necrose das células β do pâncreas, tornando-se assim, de grande interesse aos pesquisadores da área (SZKUDELSKI, 2001).

A aloxana causa insulinoopenia que desencadeia DM experimental semelhante ao DM tipo 1 em humanos, denominado diabetes aloxânico. Após a administração, a aloxana é rapidamente absorvida nas células β pancreáticas através de GLUT2, diante disso, essas células apresentam alta taxa de captação, tendo a capacidade de acumular a droga. Após sua entrada nas células β promove liberação maciça de insulina, devido ao influxo de Ca^{2+} para o citosol, com isso ocorre uma grande liberação de insulina de curta duração, em seguida, acontece à necrose das células β . Diante disso, seus efeitos patológicos são atribuídos as suas propriedades químicas, a absorção celular estritamente seletiva e a capacidade de acúmulo da droga (LENZEM, 2008; SZKUDELSKI, 2001; SZKUDELSKI; KANDULSKA; OKULICZ, 1998).

As fases de indução são caracterizadas por: 1ª fase (hipoglicêmica, duração de 30 minutos após a indução, devido à hiperinsulinemia decorrente do súbito aumento de ATP), 2ª fase (hiperglicêmica, uma hora após a indução, duração de 2 a 4 horas é decorrente da toxicidade às células β), 3ª fase (hipoglicêmica, duração de 12 horas, altas concentrações de insulina no sangue, uma vez que, acontece ruptura da membrana das vesículas secretoras de insulina, com isso, a membrana plasmática celular se rompe, resultando em hipoglicemia grave, tais mudanças são irreversíveis e indicam morte celular por necrose das ilhotas pancreáticas) e 4ª fase (hiperglicêmica, com instalação do DM).

Em acréscimo, a aloxana reage com dois grupos-SH, local de ligação da glicose a glucoquinase, resultando na formação de ponte de dissulfureto e inativação da enzima. Esse mecanismo de ação pode ser prejudicado na presença de glicose intracelular. Como resultado a essa ação, ocorre redução da aloxana a ácido dialúrico, esse é então re-oxidado de volta ao aloxana para estabelecer um ciclo redox para a geração de radicais superóxido. A auto-oxidação de radicais superóxido geram radicais altamente reativos como O_2^- , H_2O_2 e HO^- , esses radicais

afetam o metabolismo oxidativo da célula causando necrose seletiva (LENZEM, 2008; SZKUDELSKI, 2001).

Outro mecanismo envolvido é o efeito dos ROS sobre o DNA das ilhotas pancreáticas, induzindo quebras simples e duplas, causando fragmentação do DNA. Além disso, a aloxana causa ativação da enzima poli-ADP-ribose, por depleção de NAD^+ isso leva a alterações nas funções celulares de síntese de ATP e síntese de proteínas, causando a morte celular (YAMAMOTO; UCHIGATA; OKAMOTO, 1981; SZKUDELSKI, 2001).

Alguns fatores podem influenciar na ação diabetogênica da aloxana, sendo esses imprescindíveis para a indução de maneira satisfatória que resulta em maior número de animais diabéticos, menor índice de mortalidade e manutenção dos animais em boas condições. Os fatores envolvidos são dose, concentração da droga, via de administração, velocidade de infusão, dieta, tempo de jejum, espécie e peso do animal, além de outras substâncias que possam influenciar em seu mecanismo de ação, por exemplo, os bloqueadores de canais para Ca^{2+} (LERCO et al., 2003).

A maioria dos estudos utiliza a via intravenosa na maior parte das espécies, pois os efeitos são mais evidentes. Entretanto, o índice de mortalidade é superior por essa via, uma vez que a liberação maciça de insulina é seguida de morte encefálica (LERCO et al., 2003).

A alimentação prévia dos animais altera a sensibilidade a aloxana. Em dietas ricas em lipídeos os ratos se tornam mais sensíveis, com taxa de mortalidade de 90 a 100%, no entanto, numa dieta rica em proteínas e carboidratos essa taxa diminui para 33 a 40% de mortalidade (LERCO et al., 2003). Por outro lado, estudos mostram que o jejum é ideal para a eficiência da ação da aloxana. Em jejum prolongado, de 48 a 60 horas, cerca de 95% dos ratos se tornaram diabéticos, quando o jejum não foi bem observado apenas 25% dos animais ficaram diabéticos (LUKENS, 1948). Por fim, o tempo de jejum pode variar de 12, 24, 48 e 60 horas, revelando que a sensibilidade aumenta com o aumento do tempo de jejum.

Com relação às espécies utilizadas, a maioria das pesquisas tem sido realizada em ratos. Isso, devido ao baixo custo de manutenção, necessidade de menor espaço físico, fácil manipulação, resistência a infecção, rapidez de reprodução e pela semelhança do arcabouço enzimático, metabólico, histológico e fisiológico com o DM na espécie humana (LERCO et al., 2003).

Com relação às alterações fisiológicas observadas no diabetes aloxânico, foi observada a reprodução dos sintomas clínicos e laboratoriais do DM tipo 1 em humanos, como: perda de peso, polidipsia, polifagia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia, hipertriacilglicerolemia e cetonemia (LERCO et al., 2003; LEZEN; PANTEN, 1988). A característica de cronicidade do DM também é reproduzida sendo observado, o desenvolvimento das complicações crônicas do DM humano, como: retinopatia, nefropatia, neuropatia e cardiopatia diabéticas, assim como as macroangiopatias e a disfunção endotelial (ARONSON, 2008).

Estudos mostram a presença de disfunção endotelial em modelos experimentais de DM, essa disfunção é modulada pelo grau de hiperglicemia, o tempo de duração do DM, as concentrações séricas de insulina e pela presença de complicações crônicas, especialmente neuropatia autonômica e microalbuminúria (ARONSON, 2008; BERTOLUCI et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, a neuropatia diabética atinge o sistema nervoso autônomo prejudicando a velocidade de condução nervosa, ocorrendo entre outros citados, alterações nas respostas cardíacas, sendo essa denominada cardiopatia diabética. Em humanos a neuropatia autonômica se manifesta primeiro no nervo vago, que corresponde a 75% da atividade parassimpática, diante desse comprometimento vagal ocorre uma predominância simpática levando a hipertensão e aumento da frequência cardíaca, com isso há aumento da mortalidade de diabéticos por distúrbios do controle cardiovascular com infarto do miocárdio não sintomático e consequente morte súbita devido a arritmias (BERTOLUCI et al., 2008).

No entanto, os modelos experimentais de DM induzidos quimicamente têm apresentado alguns resultados contraditórios aos que acontecem em humanos. Em ratos, foram observadas complexas anormalidades metabólicas que levam a alteração da estrutura e da função do miocárdio, com hipotensão e bradicardia basais, o que sugere que a cardiopatia diabética nesses modelos está associada neuropatia autonômica simpática e parassimpática. A diminuição da frequência cardíaca (FC) está associada à disfunção no controle do marcapasso, além de prejuízo no quimiorreflexo e no barorreflexo (DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2009; DALL'AGO et al., 1997; MAEDA et al., 1995).

Estudos afirmam alterações cardiovasculares, como insuficiência ventricular, dilatação do ventrículo esquerdo (VE) que foi acompanhada de redução da

espessura da parede posterior do VE e do septo interventricular, indicando redução da massa do VE, além disso, houve redução do peso do coração e da massa do VE associados à disfunção cardíaca e renal (DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2009).

Diante do exposto, a indução de DM com aloxana em ratos adultos machos, sob jejum, representa um excelente modelo experimental para a pesquisa com os propósitos citados anteriormente, entre eles a descoberta de protótipos de fármacos ou tratamento coadjuvante para o DM.

2.4 Plantas medicinais hipoglicemiantes e *Terminalia catappa*

Civilizações primitivas na Europa, Índia e China já documentavam o uso de plantas medicinais como fonte de alívio para doenças ou sensações dolorosas, dessa forma, acredita-se que o conhecimento empírico foi sendo transmitido e preservado ao longo de gerações e elaborando, com o decorrer dos séculos as farmacopéias tradicionais (SIMÕES, et al., 2003).

A colonização do Brasil promoveu uma junção dos conhecimentos indígenas sobre a vasta flora local, repassados e aprimorados geração após geração, com os conhecimentos europeus e africanos de plantas vindas desses continentes (DI STASI, 1996). No entanto, o conhecimento tradicional das plantas medicinais no Brasil foi deixado de lado durante os períodos da industrialização e urbanização, sendo novamente valorizado com as recentes tendências globais de biodiversidade e desenvolvimento sustentável (SIMÕES, et al., 2003).

Para algumas comunidades, o uso de plantas medicinais representa o único recurso terapêutico (DI STASI, 1996; SIMÕES, et al., 2003). Portanto, investigar esses conhecimentos seculares favorece a descoberta de novos medicamentos, tratando-se de um dos objetivos da etnobotânica (ALBUQUERQUE, 2002). A pesquisa de plantas medicinais é benéfica em vários aspectos, como: descoberta de protótipos com a finalidade de melhor qualidade de vida em patologias crônicas ou agudas, descoberta de fontes para compostos químicos e/ou fitoterápicos, com isso tendo importantes efeitos econômicos, viabilizar a movimentação de capital para a indústria farmacêutica, e especialmente incentivar a conservação da biodiversidade.

No ano de 2001, o Ministério da Saúde do Brasil apresentou um programa de plantas medicinais e fitoterápicos, com a finalidade de estabelecer uma relação

nacional de medicamentos fitoterápicos para a atenção básica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

No Brasil, o principal órgão fiscalizador da regulamentação e a comercialização de drogas de origem vegetal é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Suas regras ainda não conseguem impedir a fraude e a má qualidade dos fitoterápicos, esse fator quando somado a utilização algumas vezes incorreta pela população, favorecem a ineficiência dos produtos comercializados. As plantas medicinais da flora nativa brasileira são consumidas sem comprovação de suas propriedades farmacológicas, além disso, sua toxicidade é um problema sério para a saúde pública. Com frequência ocorre junção dos efeitos adversos dessas plantas medicinais com possíveis adulterações e interação com outras drogas.

No DM, a normoglicemia é raramente alcançada, isso aliado às complicações crônicas características da doença, impulsionam os pacientes a procurar tratamentos coadjuvantes e não raro, utilizam plantas medicinais. Os mecanismos de ação a partir dos quais as plantas medicinais diminuem a glicemia sanguínea podem ser: aumento da liberação de insulina pancreática, aumento do número e/ou da sensibilidade dos receptores para a insulina, aumento da resistência aos hormônios que aumentam a glicemia, aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos, aumento da microcirculação de sangue no organismo, diminuição da perda de glicogênio, eliminação de radicais livres, resistência a peroxidação lipídica e melhora da desordem metabólica sobre lipídeos e proteínas (MARLES FARNSWORTH, 1995; SAID et al., 2002; VOLPATO; DAMASCENO; CALDERON, 2002), tornando-se agentes terapêuticos em potencial na prevenção e no tratamento das complicações do diabetes.

Na literatura, várias famílias e gêneros têm sido amplamente estudados por seus efeitos benéficos no tratamento do DM. Entre eles está o gênero *Artemisia* pertencente à família Compositae. A espécie *Artemisia dracunculoides* L. tem efeitos hipoglicêmicos relatados por diversos pesquisadores (RIBNICKY et al., 2009; WANG et al., 2011), promove melhora da resistência à insulina em modelos de ratos resistentes, provavelmente, devido a modulação da degradação proteica muscular esquelética e da atividade da fosfatase (WANG et al., 2011). A partir do extrato etanólico de *A. dracunculoides* foram isolados 4,5-di-O-cafeoilquínico, 6-demethoxycapillarisin, e 2', 4'-di-hidroxi-4-methoxydihydrochalcone, esses compostos apresentam efeitos inibitórios para o enzima aldose redutase, uma

enzima chave envolvida nas complicações diabéticas, o que pode explicar o efeito anti-diabético (LOGENDRA et al., 2006). Os compostos bioativos em *A. dracunculus* também incluem davidigenin, sakuranetina, e 5-O-cafeoilquínico (EISENMAN et al., 2011). O extrato de *Artemisia santonicum* exerceu um efeito hipoglicemiante em coelhos cujo diabetes foi induzido por aloxano (KORKMAZ; GÜRDAL, 2002). O extrato das folhas de *Artemisia herba-alba* causou redução de glicose sanguínea em 14 dos 15 pacientes diabéticos estudados, com melhora da sintomatologia. Não foram registrados efeitos colaterais durante ou após o tratamento (AL-WAILI, 1986). A administração oral do extrato aquoso de *A. herba-alba* apresenta efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos induzidos por aloxana, apresenta ainda, proteção contra a perda de peso de animais diabéticos e pode aliviar os distúrbios induzidos da frequência cardíaca e parâmetros hematológicos de ratos diabéticos (MANSI; LAHHAM, 2008). O extrato das folhas de *A. campestris* melhora a nefropatia diabética precoce em ratos por inibir a formação de produtos finais da glicação avançada e por melhora na liberação de óxido nítrico (SEFI et al., 2012).

Um exemplo importante é o gênero *Bauhinia*, pertencente à família Caesalpinioideae, cujas espécies *B. forficata* e *B. monandra* apresentam ação hipoglicemiante devido à presença de glicosídeo de flavonóides (MENEZES et al., 2007). Os polifenóis (flavonóides) presentes no extrato hidroalcoólico das sementes da *B. variegata* mostraram efeito hipoglicemiante em ratos induzidos por streptozotocina (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002). O extrato de *B. divaricata* apresentou atividade hipoglicemiante, atribuída à sua capacidade de inibir a β -amilase (ANKLI et al., 2002). A fração *n*-butanólica do extrato das folhas da *B. forficata* diminuiu os níveis de glicose sanguínea, através da redução da sua absorção intestinal (SILVA et al., 2002). Em outro estudo, o decocto de *B. forficata* promoveu melhora no metabolismo dos carboidratos provavelmente por agir de maneira similar à biguanida, um hipoglicemiante (PEPATO et al., 2002). Os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *B. forficata* podem reduzir a taxa de glicose, triglicerídeos e colesterol, sendo útil no tratamento do DM tipo 2 (LINO et al., 2004). O efeito hipoglicemiante da *B. forficata* foi confirmado em diabéticos após a ingestão crônica do chá por 45 dias (SIXEL; PECINALLI, 2005). Estudo com o extrato metanólico de *B. cheilantha*, afirma que esta planta apresenta efeito hipoglicemiante na dose de 600 mg/Kg em ratos diabéticos induzidos com a aloxana (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

No gênero *Cassia*, pertencente à família Leguminosae, o extrato aquoso das folhas de *Cassia auriculata* apresenta atividade hipoglicêmica, atribuído ao aumento do consumo da glicose periférica (SABU; SUBBURAJU, 2002). O extrato das flores de *C. auriculata* tem atividade antidiabética, que foi mais efetiva do que do fármaco antidiabético glibenclamida, além de promover decréscimo da peroxidação de lipídeos e aumento no nível da glutathione reduzida, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase, revelando suas propriedades antioxidantes (PARI; LATHA, 2002). O extrato metanólico das flores de *C. auriculata* possui efeito antihiperlipidêmico, semelhante ao fármaco acarbose, através da inibição da enzima α - glicosidase (ABESUNDARA; MATSUI; MATSUMOTO, 2004). Extrato aquoso de *Cassia occidentalis* apresenta atividade anti-hiperglicêmica em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano, além de melhorar parâmetros como o peso corporal, perfil lipídico e promover regeneração de células β do pâncreas (VERMA, 2010). O extrato das folhas de *Cassia javanica* possui atividade hipoglicêmica em normais e diabéticos, com redução de 37,62% no nível de glicose no sangue de ratos diabéticos em 10 dias ([KUMAVAT](#); [SHIMPI](#); [JAGDALE](#), 2012).

Quanto ao gênero *Enicostema*, pertencente à família Gentianaceae, a espécie que tem despertado maior interesse é o *Enicostema littorale*, uma vez que, o extrato aquoso de *Enicostema littorale* é um antidiabético natural por melhora na sensibilidade da insulina, promove aumento da liberação de insulina dependente do canal para K^+ sensível a ATP, porém não requer o influxo de íons cálcio, sua ação ocorre somente em condições hiperglicêmicas (MAROO et al., 2002). Além disso, o extrato diminuiu a concentração de glicose e lipídeos no soro, impedindo a disfunção renal nos ratos diabéticos (MURALI; UPADHYAYA; GOYAL, 2002; MAROO; VASU; GUPTA, 2003). Comprimidos preparados com *E. littorale* foram administrados em 84 pacientes com diabetes tipo 2, houve redução da glicose no sangue, por aumento dos níveis de insulina plasmática, impediu a progressão das complicações renais em pacientes diabéticos e do perfil lipídico (UPADHYAY; GOYAL, 2004).

No gênero *Momordica* da família Cucurbitaceae, os extratos dos frutos, folhas e raízes de *Momordica charantia* são eficientes no tratamento da diabetes tipo II (MIURA et al., 2004; SENANAYAKE et al., 2004). O extrato de *M. charantia* tem efeito protetor glomerular, impede o aumento do volume da urina, redução na taxa de glicose no plasma. O efeito hipoglicêmico permanece apesar da destruição da

maioria das células β , indicando um efeito insulino mimético direto (GROVER et al., 2001). O extrato aquoso de *M. charantia* atenuou a hiperglicemia e hiperinsulinemia quando administrado por via oral em ratos diabéticos (VIKRANT et al., 2001). O extrato aquoso dos frutos de *Mormodica cymbalaria* produziu diminuição máxima na concentração de glicose em ratos diabéticos depois de 3 horas da administração, porém não foi observada atividade hipoglicemiante nos ratos normais. O tratamento oral durante seis semanas mostrou atividades, anti-hiperglicemiante e anti-hiperlipidêmica significativas em ratos que tiveram o diabetes induzido por aloxano (KAMESWARA RAO; KESAVULU; APPARAO, 2001). O extrato de *M. charantia* exerceu efeito hipoglicemiante provavelmente através do aumento da atividade da fosfofrutoquinase, a principal enzima envolvida na etapa glicolítica (RATHI; GROVER; VATS, 2002). O extrato de *M. charantia* impediu o desenvolvimento da catarata (RATHI et al., 2002).

Os estudos com o gênero *Syzygium*, da família Myrtaceae, revelaram que o tratamento profilático com infusão das folhas de *Syzygium cumini* apresentou efeito protetor contra os danos pancreáticos causados por aloxana em ratos (ZANOELLO et al., 2002). O extrato aquoso das sementes de *S. cumini* reduziu os danos ao tecido encefálico de ratos diabéticos, causou decréscimo nos lipídeos, aumentou a concentração das enzimas catalase e superóxido dismutase no cérebro de ratos que tiveram o diabetes induzido por aloxano. Os extratos aquosos e etanólicos apresentaram efeito hipoglicemiante mais acentuado do que a glibenclamida (PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 2003). O extrato aquoso de *Syzygium alternifolium* apresentou efeito hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano, as frações hexânica e etanólica também tiveram atividade hipoglicemiante, mas com menor efeito do que no extrato aquoso (RAO; RAO, 2001).

Outro gênero que tem se destacado entre as espécies de interesse medicinal no tratamento do DM é o gênero *Terminalia*, pertencente à família Combretaceae. Devido ao uso na medicina popular, ao crescente número de estudos realizados e a importante presença de metabólitos secundários, terpenóides e flavonoides, na composição química desse gênero. As plantas pertencentes à família Combretaceae estão distribuídas em cerca de 600 espécies, ocorrem em regiões tropicais e subtropicais, apresentam-se como árvores e arbustos. Trata-se de uma família formada por 18 gêneros, sendo os dois gêneros de maior ocorrência *Terminalia* e

Combretum, cada um com 250 espécies. Com relação à composição química é uma família bastante diversificada, apresentando taninos, flavonóides, triterpenóides e lignanas (YADAVA; RATHORE, 2000; LIN et al., 2000; KHAN; KIHARA; OMOLOSO, 2002; GARCEZ et al., 2003).

No sul da África, as plantas da família Combretaceae são utilizadas na medicina popular no tratamento de dores abdominais, nas costas, ouvidos, dentes e cabeça, contra a esquistossomose, resfriados, conjuntivites, diarréia, parasitos intestinais, infertilidade feminina, lepra, pneumonia, mordida de cobras, sífilis e caxumba. Espécies do gênero *Combretum* apresentam flavonóides como a epigenina, genkwanina, rhamnocoltrina e kaempferol, que lhes conferem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Por conseguinte, tais compostos também apresentam atividade contra *Vibrio colerae* e *Enterococcus faecalis*. Além disso, foram demonstradas a presença de taninos e saponinas com atividade antifúngica e o extrato metanólico das folhas de *Combretum micranthum* apresentou atividade antiinflamatória (PIETROVSKI, 2004).

De forma semelhante, as plantas do gênero *Terminalia* são ricas em metabólitos secundários como triterpenóides pentacíclicos e seus derivados glicosilados, taninos, flavonóides e compostos aromáticos (SIMÕES, et al. 2003; ARAÚJO; CHAVES, 2005). Apresentam diversas atividades farmacológicas tais como antidiabética, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, anti-HIV-1 e antimalárica (GARCEZ et al., 2003; ARAÚJO; CHAVES, 2005).

Estudos demonstram que a administração oral do extrato etanólico dos frutos de *Terminalia pallida* Brandis apresentou atividade anti-hiperglicemiante em ratos diabéticos induzido por aloxana (RAO et al., 2003). Extrato metanólico dos frutos de *T. bellirica* reduziu 54 % da hiperglicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxana (SABU; KUTTAN, 2009) e o extrato dos frutos estimulou a secreção de insulina (KASABRI; FLATT; ABDEL-WAHAB, 2010).

A espécie vegetal *Terminalia catappa* Linn, popularmente conhecida como amendoeira, chapéu-de-praia e castanhola, ilustrada na Figura 3, é originária da Malásia, está distribuída em regiões litorâneas tropicais e subtropicais (FAN et al., 2004). Trata-se de uma árvore de tronco alto, áspero e tortuoso, com galhos dispostos horizontalmente. Tem folhas grandes, obcordiformes e agrupadas nas extremidades dos ramos, a coloração varia com a idade entre verde intenso ao vermelho rubro. As flores são pequenas de coloração branco-rósea, apétalas

dispostas em espigas axilares e drupa elíptica, glabra e achatada com cerca de 5 cm de comprimento, indeiscente e de mesocarpo comestível. Os frutos são amarelos ou vermelho claro, a casca do caule é adstringente com alto grau de taninos. Muito encontrada em praias por ter facilidade de desenvolvimento em terrenos arenosos e salinos, além da capacidade de resistir aos efeitos do vento (BRAGA, 1976).

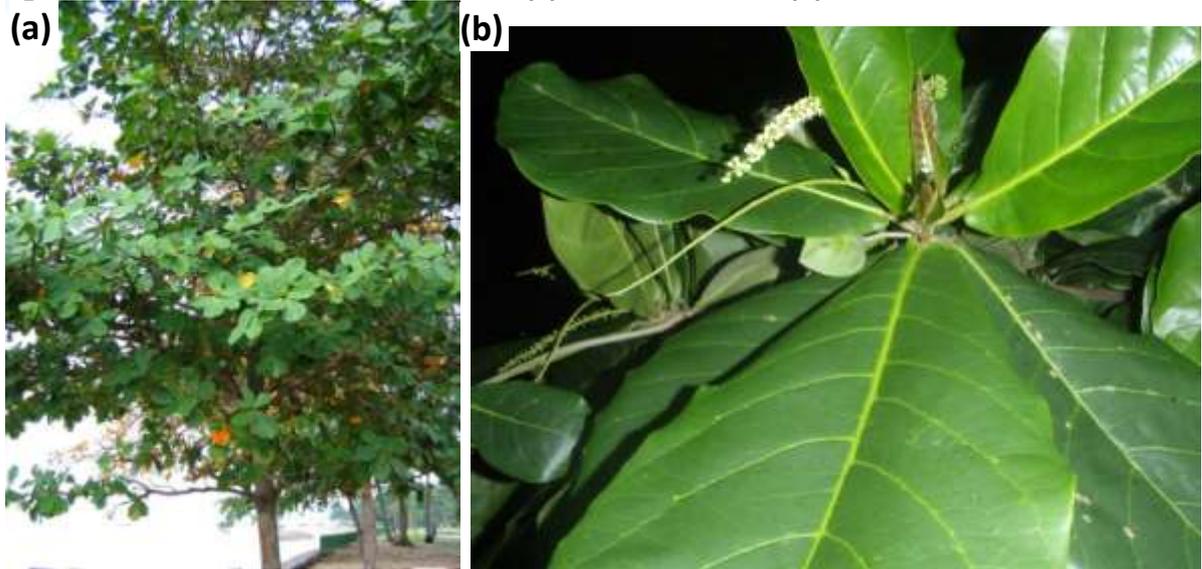
No sudeste da Ásia é utilizada como antipirético, no combate às diarreias, dermatites, hepatite, diabetes e na prevenção de hepatoma (CHEN et al., 2000; NAGAPPA et al., 2003; GOUN et al., 2003; GAO et al., 2004, CHYAU; KO; MAU, 2006). Em Taiwan, as folhas são usadas para a prevenção e tratamento de hepatites e doenças do fígado (CHYAU; KO; MAU, 2006). Na Índia, Filipinas, Malásia e Indonésia, as folhas, cascas e frutos são usados como antidiarréico, antipirético e hemostático. No Brasil tem sido utilizada na medicina popular em doenças das vias respiratórias, disenterias e diarreias (CORRÊA, 1984; CRUZ, 1982).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença dos constituintes majoritários das folhas: taninos hidrolisáveis, dentre os quais a punicalina e a punicalagina (CHEN et al., 2000; LIN et al., 2000); flavonóides glicosilados foram isolados da fração em n-butanol do extrato etanólico das folhas (LIN et al., 2000); ácidos triterpênicos, como o ácido ursólico e o ácido 2 α , 3 β , 23-triidroxi -12-en-28-óico foram isolados da fração em clorofórmio do extrato etanólico das folhas e considerados prováveis responsáveis pela atividade antiinflamatória apresentada (FAN et al., 2004).

A pesquisa das atividades farmacológica e biológica dos taninos têm sido de grande interesse na pesquisa. Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas atividades destacam-se: ação bactericida, fungicida, antiviral, antioxidante, antitumoral, antidiabética, inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* e elevada atividade moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985; SIMÕES, 2003).

A avaliação farmacológica do extrato das folhas apresentou atividade hepatoprotetora (TANG et al., 2006; GAO et al., 2004), diferentes extratos das folhas apresentaram efeito antioxidante (CHYAU et al., 2002; CHYAU; KO; MAU, 2006). Estudos afirmam que o extrato aquoso das folhas de *T. catappa* exibiu atividade antidiabética (AHMED et al., 2005) e o extrato dos frutos de *T. catappa* diminuiu os níveis de glicose no soro sanguíneo de ratos diabéticos induzidos por aloxana (NAGAPPA et al., 2003).

Figura 3 – *Terminalia catappa*, árvore (a), folhas e frutos (b).



Fonte: http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?where-taxon=Terminalia+catappa (acessado em Janeiro de 2013).

Não existem estudos publicados sobre o efeito antidiabético do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa*, assim como de seu potencial anti-hiperglicemiante, de seus efeitos metabólicos e cardiovasculares em ratos diabéticos e não-diabéticos. Além disso, tendo em vista o crescente interesse pelo gênero *Terminalia*, a importância do estudo de plantas medicinais com efeitos benéficos sobre o DM, o uso na medicina popular de *Terminalia catappa* no DM e sua abundância na flora brasileira, essa espécie se tornou o alvo desse estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antidiabético do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa* (Combretaceae) em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a prospecção química do extrato;
 - Avaliar o efeito do tratamento crônico com o extrato sobre:
 - ✓ o peso corporal de ratos diabéticos e não diabéticos;
 - ✓ o perfil glicídico de ratos diabéticos e não diabéticos;
 - ✓ o teste de tolerância oral à glicose de ratos diabéticos e não diabéticos;
 - ✓ o perfil lipídico de ratos diabéticos e não diabéticos;
 - ✓ marcadores de função renal de ratos diabéticos e não diabéticos;
 - ✓ marcadores de função hepática de ratos diabéticos e não diabéticos;
 - ✓ os parâmetros hemodinâmicos de ratos diabéticos e não diabéticos.
-

4 MATERIAL

4.1 Material botânico: casca do caule de *Terminalia catappa*

A espécie *Terminalia catappa* foi coletada no município de Maceió, no Campus A. C. Simões da Universidade Federal de Alagoas, em fevereiro de 2009, sendo identificada pela botânica, Rosário de Fátima de Almeida Rocha, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), da Universidade Federal de Alagoas. Um exemplar do referido material encontra-se catalogado sob o número 03805 no Herbário Professor Honório Monteiro (MUFAL), do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS)/UFAL, sediado no Museu de Historia Natural.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*), machos adultos da linhagem Wistar, pesando em média 260 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Brasil. Antes do início do estudo os animais passaram por um período de aclimação de sete dias às condições do laboratório e permaneceram sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. Todos os experimentos desenvolvidos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFAL, certidão número 015018/2011-18.

4.3 Substâncias

Para a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: aloxano monoidratado (Sigma – Aldrich), tiopental sódico (Cristália), sal sódico de heparina (Roche), diluídas em salina, para concentrações desejadas.

5 MÉTODOS

5.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa*

O extrato foi cedido pelo *Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais* (LPqPN) – UFAL . Para a preparação do extrato hidroalcoólico, 2.650,0 g das cascas do caule foram submetidas à secagem à temperatura ambiente da droga vegetal, seguida de trituração. O extrato foi obtido através de maceração com etanol 90 % por 3 vezes. Após concentração das soluções, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, foram obtidos 398,5 g do extrato bruto, tendo um rendimento de 15,03%.

5.2 Prospecção química

Uma alíquota do extrato (1 mg/mL) foi submetida aos testes de triagem para classes de produtos naturais de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997) modificado.

5.3 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido pela administração intravenosa de aloxana, a partir da veia dorsal peniana, diluída em solução salina (0,9%) na dose de 40 mg/Kg de peso corporal (LERCO et al., 2003), realizada em jejum de aproximadamente 20 horas. Após quinze dias da indução foi verificada a glicemia em jejum, através de coleta de sangue por secção da calda com auxílio de monitor de glicemia (TRUEread™). Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia acima de 200 mg/dL. Foi verificado 35% de mortalidade dos ratos no período de instalação do diabetes experimental.

5.4 Delineamento experimental

Os animais foram randomizados em quatro grupos com dez animais cada, conforme abaixo:

- Grupo não diabético tratado com solução salina 0,9% (NDS);
- Grupo não diabético tratado com extrato 200 mg/Kg (NDE);
- Grupo diabético tratado com solução salina 0,9% (DS);
- Grupo diabético tratado com extrato 200 mg/Kg (DE);

No 15º dia após a indução do diabetes, os quatro grupos foram subdivididos, sendo cinco ratos de cada grupo destinados ao teste de tolerância oral a glicose, seção 4.6.3., e os demais ratos submetidos ao tratamento diário com extrato 200 mg/Kg em 0,3 mL, por gavagem (via oral) até o 30º dia de protocolo experimental.

5.5 Peso corporal dos ratos

Os animais foram pesados individualmente em balança semi-analítica nos dias zero (um dia antes da indução do DM), 14º dia e 30º dia, dias em que não se encontravam em período de jejum.

5.6 Perfil glicídico

5.6.1 Glicemia de jejum

Após 12 horas em jejum foi realizada a coleta de 50 µL de sangue por secção da calda e com auxílio de monitor de glicemia (TRUEread™) para determinar a glicemia de jejum baseada em um sistema amperométrico. Nesse sistema a glicose presente no sangue total é oxidada através da ação da enzima glicose oxidase formando ácido glucônico. Os elétrons gerados nessa reação são transferidos do sangue para os eletrodos e a corrente resultante é proporcional a concentração de glicose no sangue que é quantificada e convertida para uma leitura no monitor.

5.6.2 Hemoglobina glicada

HbA1c foi determinada por método de Trivelli modificado, através de kit Labtest, utilizando a técnica de microcromatografia de separação rápida. O método se baseia na interação de antígeno e anticorpo para a determinação direta de HbA1c do sangue total. O sangue coletado com anticoagulante é hemolisado, em seguida,

hemoglobina total e HbA1c se ligam as partículas do látex. Quando o anticorpo antiHbA1c é adicionado, forma-se o complexo látex-HbA1c-anticorpo, em seguida é adicionado anti-anticorpo e ocorre aglutinação que é proporcional a concentração de HbA1c na amostra. Então, o valor de HbA1c é obtido através da curva de calibração.

5.6.3 Teste de tolerância oral a glicose

No 15º dia após a indução do DM os animais dos quatro grupos (n=5), em jejum, foram submetidos ao teste de tolerância oral à glicose, para ser avaliação do potencial anti-hiperglicemiante agudo do extrato, 200 mg/Kg v.o., após a sobrecarga de 2g de glicose por Kg de animal. Em seguida as administrações da glicose e do extrato a glicemia dos animais foi verificada a glicemia sanguínea por secção da calda e com auxílio de monitor de glicemia nos tempos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 minutos.

5.7 Perfil lipídico

5.7.1 Colesterol total

O sangue foi acondicionado em tubos livre de anticoagulante e centrifugado para a separação do soro, a partir desse, determinado o colesterol total usando um sistema enzimático através de kit Labtest. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase formando colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é então oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Por fim, na presença de peroxidase e peróxido de hidrogeno, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absortividade máxima em 500 nm em espectofotômetro de ultravioleta. O produto final formado confere com vermelha a amostra analisada que é diretamente proporcional a concentração de colesterol na amostra.

5.7.2 Colesterol HDL

As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) plasmáticas precipitam após a centrifugação do sangue, diante

disso, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) foram determinadas no sobrenadante utilizando sistema enzimático Labtest, onde por ação do ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio essa precipitação é seletiva e quantitativa. Também se trata de um sistema de medida colorimétrica em 500 nm de comprimento de onda.

5.7.3 Colesterol LDL

O LDL foi determinado usando a equação de Friedewald, onde: $LDL = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$, desde que a concentração de triglicérides não ultrapassem 400 mg/mL e não pertençam a pacientes portadores de lipoproteinemia do Tipo III.

5.7.4 Triglicérides

Os triglicérides plasmáticos foram determinados por sistema enzimático colorimétrico utilizando kit Labtest, onde, a lipoproteína lípase promove sua hidrólise liberando glicerol, que por ação da glicerolquinase forma glicerol-3-fosfato que é então oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio, na presença de glicerolfosfato oxidase. Por fim, por ação da peroxidase ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-cloranfenicol, produzindo quinoneimina com absorvância em 505 nm que também promove cor vermelha que é proporcional a concentração de triglicérides na amostra.

5.7.5 Colesterol VLDL

O VLDL foi determinado usando a equação de Friedewald, onde: $VLDL = \text{Triglicérides}/5$.

5.8 Marcadores de lesão renal

5.8.1 Ureia

A ureia foi determinada a partir do soro sanguíneo, por um sistema enzimático cinético onde, a ureia é hidrolisada pela urease formando amônia e dióxido de carbono. A amônia reage com 2-cetoglutarato e NADH pela ação enzimática da glutamato desidrogenase NADH é oxidado a NAD. A absorvância medida em 340 nm é proporcional a concentração de uréia na amostra.

5.8.2 Creatinina

A creatinina foi determinada a partir o soro sanguíneo, pelo método de Jaffé UV modificado, através de kit Labtest. Trata-se de um sistema enzimático colorimétrico onde a creatinina reage com picrato em meio alcalino, o complexo formado apresenta absorvância em 520 nm, a fim de minimizar a ação de interferentes é aplicado um índice de correção de 0,25 mg/dL.

5.9 Marcadores de lesão hepática

5.9.1 Alanina amino transferase

A determinação da alanina amino transferase (ALT) ou transaminase glutâmico pirúvica (TGP) foi realizada através de método enzimático cinético utilizando kit Labtest. A ALT catalisa a transferência de um grupamento amina da alanina para o cetoglutarato, formando piruvato e glutamato. O piruvato é então reduzido a lactato por ação da enzima lactato desidrogenase e o NADH é oxidado a NAD. A absorvância em 340 nm é oriunda da oxidação do NADH, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

5.9.2 Aspartato amino transferase

A determinação de aspartato amino transferase (AST) ou transaminase glutâmico oxalacética (TGO) foi realizada por método enzimático cinético, usando kit

Labtest. A AST catalisa a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato, formando glutamato e oxalacetato. O oxalacetato por ação da malato desidrogenase é então reduzido a malato e a coenzima NADH é oxidada a NAD. A absorvância em 340 nm é resultante da oxidação do NADH e é proporcional a atividade da AST na amostra.

5.10 Parâmetros hemodinâmicos

No 30^o dia do protocolo experimental (fim do tratamento), os ratos foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/Kg, i.p.), em seguida, cateter de polietileno, um segmento de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1: 20 v/v), foi implantado na aorta abdominal, via artéria femoral esquerda.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas após o procedimento cirúrgico, com os animais ainda sob anestesia, pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (BLPR, AECAD, Brasil) pré-calibrado acoplado a um amplificador (Modelo 04P, AECAD, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital usando um software AQCAD (AVS Projetos, SP, Brasil). A frequência escolhida para amostragem dos dados foi de 500 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calcula a pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). Após 15 minutos de estabilização foi realizado o registro de 30 minutos para posterior análise. Após os experimentos os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (i.v.).

5.11 Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M., adotando um nível de significância de $p < 0,05$. Para o tratamento estatístico foi utilizado a análise de variância ANOVA, One-way seguido de Newman-Keuls e Two-way seguido de Bonferroni quando necessário.

6 RESULTADOS

6.1 Classes de produtos naturais identificados na prospecção química do extrato

A prospecção química do extrato hidralcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa*, revelou pH (potencial hidrogeniônico) neutro, igual a 7. As classes de produtos naturais identificados estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Prospecção química do extrato etanólico das cascas do caule de *Terminalia catappa*.

Prospecção química	EETC
Teste para taninos e fenóis	+
Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	+
Teste para leucoantocianidinas, catequinase flavonas	+
Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	+
Teste para esteróides e triterpenóides	+
Teste para saponinas	+
Teste para alcalóides	-

Legenda: (+) presença de compostos; (-) ausência de compostos.

Fonte: Autora, 2013.

6.2 Efeito do tratamento com extrato sobre o peso corporal dos ratos

Na tabela 2 pode ser verificado que o peso corporal dos grupos DS e DE, até no período de instalação do DM (entre a indução e o início do tratamento), apresentou diminuição ($p < 0,001$) 11% de peso corporal.

Tabela 2 – Peso corporal (g) dos ratos durante o experimento.

	Início do protocolo	15º dia – início do tratamento	30º dia – fim do tratamento
NDS	267,4 ± 9,8	271,6 ± 10,9	277,1 ± 6,5
NDE	267,4 ± 9,8	271,6 ± 10,9	269,2 ± 9,0
DS	257,0 ± 8,2	230,8 ± 9,1 ^{a,b}	209,8 ± 9,6 ^{a,b}
DE	257,0 ± 8,2	230,8 ± 9,1 ^{a,b}	242,72 ± 5,1 ^{a,b,c}

Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,001$ vs. NDS; ^b $p < 0,001$ vs. NDE; ^c $p < 0,001$ vs. DS. Two-way ANOVA, seguido do pós teste Bonferroni.

Fonte: Autora, 2013.

O grupo DS apresentou no 30º dia de protocolo experimental, diminuição ($p < 0,001$) 9% de peso corporal, esse resultado acrescido à perda até o 15º dia (início do tratamento) representou 20% de perda de peso corporal total. O grupo DE no 30º dia de protocolo experimental apresentou ganho ($p < 0,001$) 5% de peso corporal, esse resultado somado a perda até o início do tratamento representou perda de 6% de peso corporal total.

6.3 Efeito do tratamento com o extrato sobre o perfil glicídico

6.3.1 Glicose plasmática

Na tabela 3 pode ser verificado que a glicose plasmática do grupo DS, até o 15º dia de protocolo experimental, apresentou aumento de glicose ($p < 0,001$) 365% e ($p < 0,001$) 372% quando comparado aos grupos NDS e NDE, respectivamente. O grupo DE, apresentou aumento de glicose de ($p < 0,001$) 355% e ($p < 0,001$) 364% quando comparado aos grupos NDS e NDE, respectivamente. No 30º dia, fim do tratamento o grupo DE apresentou diminuição da glicose ($p < 0,001$) 39% quando comparado com DE no início do tratamento e diminuição de 56% de glicose plasmática quando comparado com DS no fim do tratamento.

Tabela 3 – Glicose plasmática em jejum (mg/dL) dos ratos no início e fim do tratamento.

	15º dia – início do tratamento	30º dia – fim do tratamento
NDS	86,4 ± 1,75	89,2 ± 4,2
NDE	85,0 ± 2,54	78,4 ± 4,69
DS	401,3 ± 43,39 ^{a, b}	554,8 ± 6,93 ^{a, b}
DE	393,2 ± 20,05 ^{a, b}	241,4 ± 16,63 ^{a, b, c}

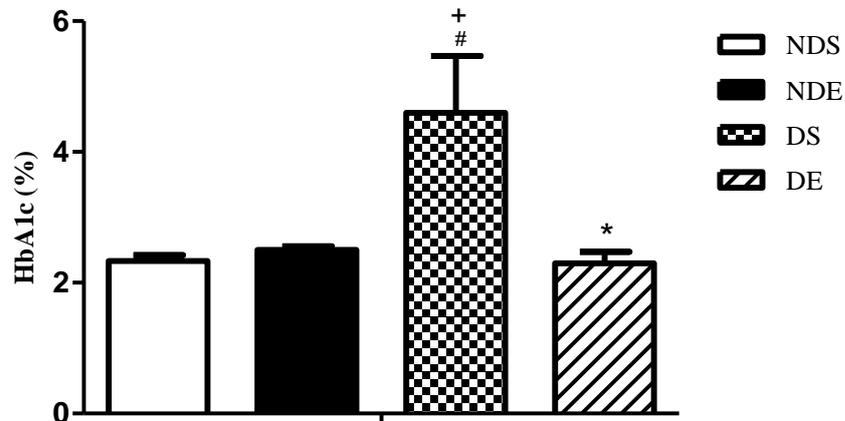
Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,001$ vs. NDS; ^b $p < 0,001$ vs. NDE; ^c $p < 0,001$ vs. DS. Two-way ANOVA, seguido do pós teste Bonferroni.

Fonte: Autora, 2013.

6.3.2 Hemoglobina glicada

No gráfico 1 pode ser verificado que a indução do DM apresentou aumento na HbA1c ($p < 0,05$) 100% e ($p < 0,05$) 84% no grupo DS quando comparado aos grupos NDS e NDE, respectivamente. No grupo DE o tratamento com o extrato apresentou diminuição ($p < 0,001$) 100% de HbA1c quando comparado ao DS.

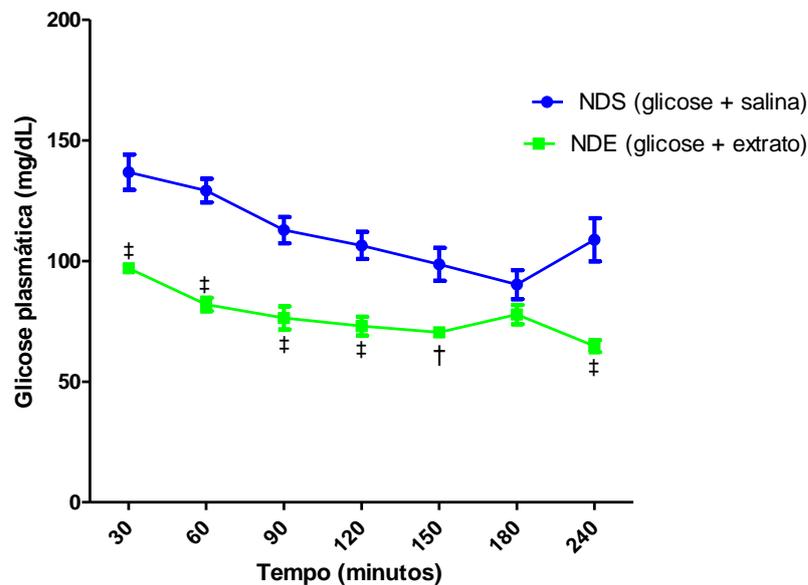
Gráfico 1 – Hemoglobina glicada (%) dos ratos no fim do tratamento.



Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média \pm E.P.M. \ddagger p<0,05 vs. NDS; *p<0,05 vs. NDE; *p<0,05 vs. DS. One-way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls.
Fonte: Autora, 2013.

6.3.3 Teste de tolerância oral a glicose

Gráfico 2 – Efeito do tratamento agudo com o extrato sobre o teste de tolerância oral a glicose.



Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE). Resultados expressos em média \pm E.P.M. \ddagger p<0,001 e \dagger p<0,01 vs. NDS. One-way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls.
Fonte: Autora, 2013.

No gráfico 2 pode ser verificado que após sobrecarga de glicose o grupo NDS apresentou aumento ($p < 0,001$) 29% (30 min), ($p < 0,001$) 37% (60 min), ($p < 0,001$) 32% (90 min), ($p < 0,001$) 31% (120 min), ($p < 0,01$) 29% (150 min) e de ($p < 0,001$) 40% (240 min) quando comparado ao grupo NDE. Os grupos DS e DE não estão apresentados, pois diante da diabetes severa apresentada os animais não resistiram à sobrecarga de glicose.

6.4 Efeito do tratamento com o extrato sobre o perfil lipídico

Na tabela 4 pode ser verificado que, o colesterol total do grupo NDE apresentou diminuição ($p < 0,05$) 38% quando com parado com o grupo NDS. O colesterol LDL do grupo NDE apresentou diminuição ($p < 0,05$) 44% quando comparado com o grupo NDS.

Tabela 4 – Perfil lipídico dos ratos no fim do tratamento.

	NDS	NDE	DS	DE
Colesterol total (mg/dL)	87,2 ± 11,7	54,5 ± 2,5 ^a	69,8 ± 0,7	69,8 ± 8,6
HDL (mg/dL)	24,3 ± 2,9	22,3 ± 8,2	21,3 ± 2,7	23,0 ± 1,5
LDL (mg/dL)	56,2 ± 8,5	31,6 ± 2,5 ^a	38,4 ± 3,3	40,4 ± 5,0
VLDL (mg/dL)	5,4 ± 0,7	4,5 ± 0,5	9,8 ± 0,2 ^{b,c}	3,3 ± 1,3 ^d
Triglicerídeos (mg/dL)	27,3 ± 2,0	20,3 ± 3,3	48,6 ± 1,4 ^{b,c}	16,7 ± 5,6 ^d

Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média ± E.P.M. ^a $p < 0,05$ e ^b $p < 0,001$ vs. NDS; ^c $p < 0,001$ vs. NDE; ^d $p < 0,001$ vs. DS. One-way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls.
Fonte: Autora, 2013.

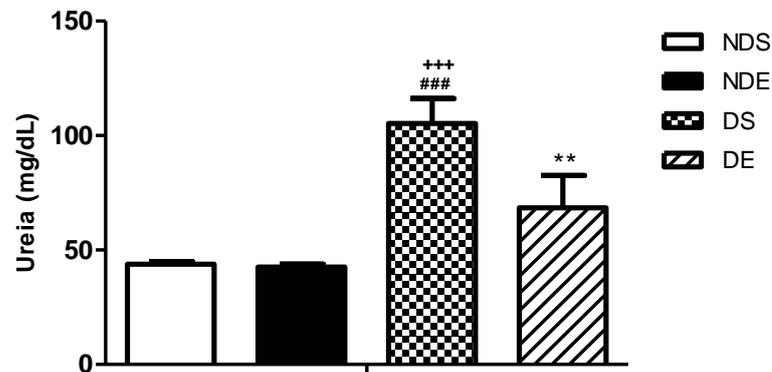
Quanto ao colesterol VLDL e triglicerídeos, o grupo DS apresentou aumento quando comparado aos grupos NDS e NDE de ($p < 0,001$) 82% e ($p < 0,001$) 120% para VLDL e ($p < 0,001$) 78% e ($p < 0,001$) 140% para triglicerídeos. Quando avaliado o grupo DE, o tratamento promoveu diminuição nos níveis de VLDL e triglicerídeos de ($p < 0,001$) 66% e ($p < 0,001$) 66%, respectivamente quando comparado ao grupo DS.

6.5 Efeito do tratamento com o extrato sobre marcadores de lesão renal

No gráfico 3 pode ser verificado que o grupo DS, apresentou 105,4 ± 10,8 mg/dL de ureia, que representa aumento ($p < 0,001$) 141% e ($p < 0,001$) 147% quando comparado aos grupos NDS e NDE, respectivamente. O grupo DE, apresentou

níveis plasmáticos de $68,4 \pm 14,1$ mg/dL de ureia uma de diminuição ($p < 0,01$) 35% quando comparado ao grupo DS.

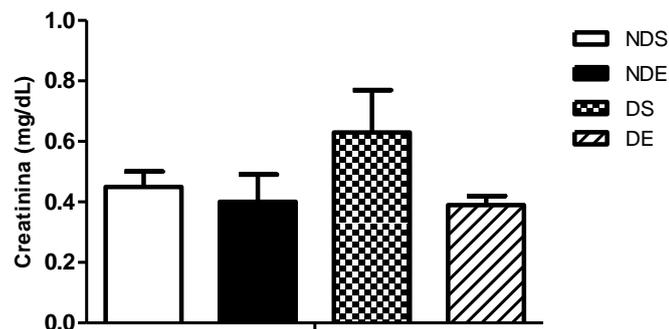
Gráfico 3 – Ureia plasmática dos ratos no fim do tratamento.



Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média \pm E.P.M. ### $p < 0,001$ vs. NDS; +++ $p < 0,001$ vs. NDE; ** $p < 0,01$ vs. DS. One-way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls.
Fonte: Autora, 2013.

No gráfico 4 pode ser verificado que a variação dos níveis de creatinina plasmática não apresentaram diferença estatística entre nenhum dos grupos.

Gráfico 4 – Creatinina plasmática dos ratos no fim do tratamento.

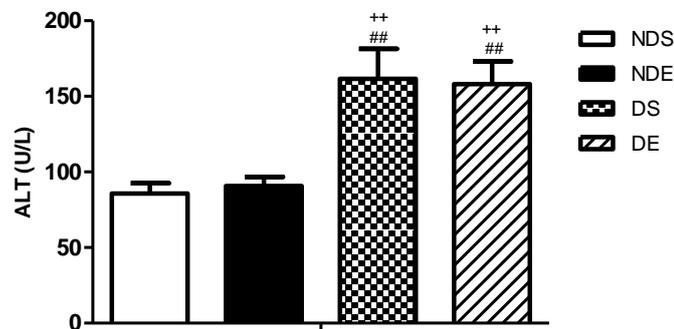


Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média \pm E.P.M. One-way ANOVA.
Fonte: Autora, 2013.

6.6 Efeito do tratamento com o extrato sobre os marcadores de lesão hepática

No gráfico 5 pode ser verificado que o grupo DS apresentou ALT plasmática de $161,6 \pm 19,8$ U/L, aumento ($p < 0,01$) 88% e ($p < 0,01$) 78% quando comparado com os grupos NDS e NDE. Quanto ao grupo DE, apresentou ALT plasmática de $158,0 \pm 15,0$ U/L, que representa aumento ($p < 0,01$) 84% e ($p < 0,01$) 74% quando comparado com os grupos NDS e NDE.

Gráfico 5 – Alanina amino transferase plasmática dos ratos no fim do tratamento.

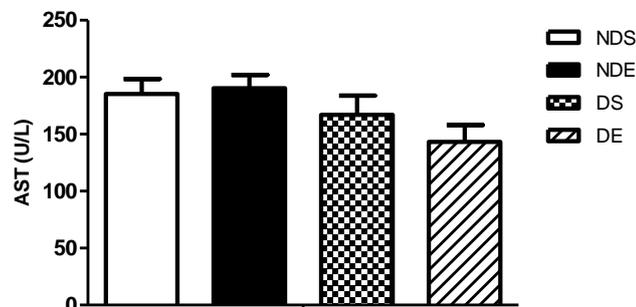


Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média \pm E.P.M. ## $p < 0,01$ vs. NDS; ++ $p < 0,01$ vs. NDE. One-way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls.

Fonte: Autora, 2013.

No gráfico 6 pode ser verificado que a variação dos níveis de AST plasmática não apresentou diferença estatística entre nenhum dos grupos.

Gráfico 6 – Aspartato amino transferase plasmática dos ratos no fim do tratamento.



Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). Resultados expressos em média \pm E.P.M. One-way ANOVA.

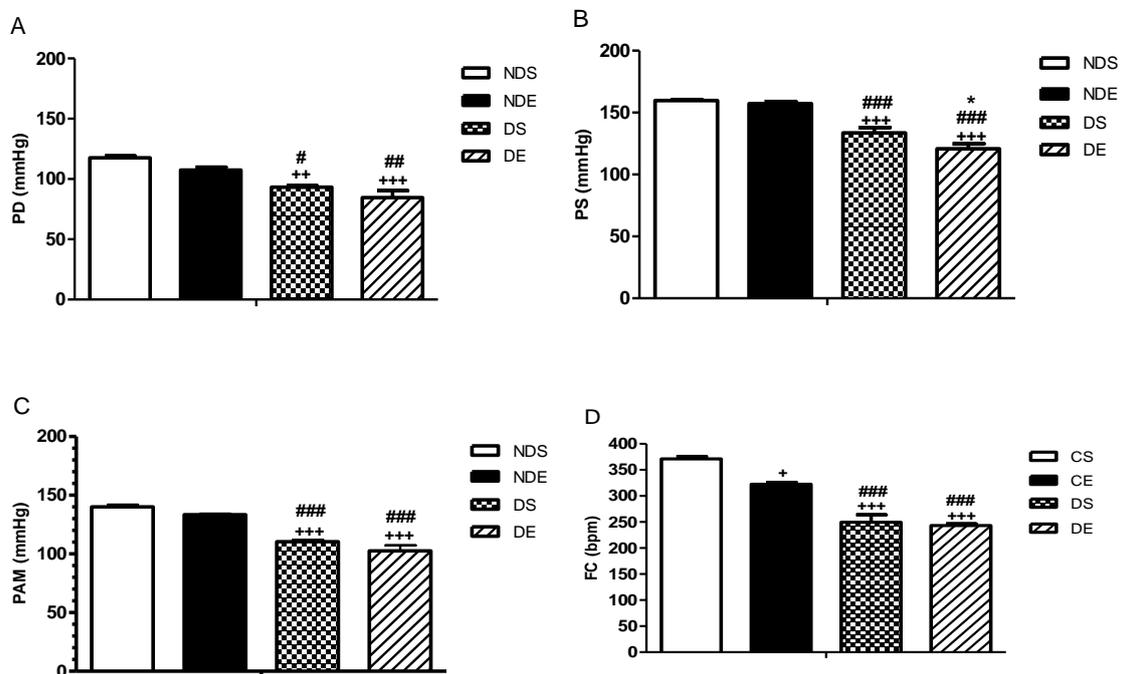
Fonte: Autora, 2013.

6.7 Efeito do tratamento com o extrato sobre os parâmetros hemodinâmicos

Os resultados de pressão arterial diastólica (PD), pressão arterial sistólica (PS), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) estão apresentados na figura 10. A indução do DM experimental causou sobre a PA diastólica no grupo DS, diminuição ($p < 0,01$) 21% e ($p < 0,05$) 13% quando comparado com os grupos NDS e NDE, respectivamente. O grupo DE quando comparado com os grupos NDS e NDE houve diminuição ($p < 0,001$) 28% e ($p < 0,01$) 21% da PA diastólica.

A PA sistólica, no grupo DS ocorreu diminuição ($p < 0,001$) 16% e ($p < 0,001$) 15% quando comparado com os grupos NDS e NDE, respectivamente. No grupo DE houve diminuição ($p < 0,001$) 24% e ($p < 0,001$) 23% da PA sistólica quando comparado aos grupos NDS e NDE. O tratamento com extrato no grupo DE promoveu diminuição ($p < 0,05$) 10% da PA sistólica quando comparado com o grupo DS.

Gráfico 7 – Parâmetros hemodinâmicos dos ratos no fim do tratamento.



Grupos (n=5) não diabético salina (NDS), não diabético tratado extrato (NDE), DS (diabético salina) e DE (diabético extrato). A: pressão diastólica (PD, mmHg). B: pressão sistólica (PS, mmHg). C: pressão arterial média (PAM, mmHg). D: frequência cardíaca (FC, bpm). Resultados expressos em média \pm E.P.M. $+++p < 0,001$ e $++p < 0,01$ e $+p < 0,05$ vs. NDS; $###p < 0,001$ e $##p < 0,01$ e $#p < 0,05$ vs. NDE; $*p < 0,05$ vs. DS. One-way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls.

Fonte: Autora, 2013.

A PAM do grupo DS quando comparado com os grupos NDS e NDE apresentou diminuição ($p < 0,001$) 21% e ($p < 0,001$) 17% da PAM. No grupo DE quando comparado com os grupos NDS e NDE houve diminuição ($p < 0,001$) 27% e ($p < 0,001$) 23% da PAM.

Na FC, o grupo NDE apresentou bradicardia, diminuição ($p < 0,05$) 13% da FC quando comparado com o grupo NDS. A indução do DM experimental causou bradicardia no grupo DS quando comparado com os grupos NDS e NDE, diminuição ($p < 0,001$) 33% e ($p < 0,001$) 23% da FC. O grupo DE quando comparado com os grupos NDS e NDE ocorreu diminuição ($p < 0,001$) 35% e ($p < 0,001$) 25% da FC.

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito antidiabético do extrato etanólico da casca do caule de *Terminalia catappa* sobre o peso corporal, perfil glicídico, perfil lipídico, marcadores de lesão renal, marcadores de lesão hepática e parâmetros hemodinâmicos de ratos com diabetes induzida por aloxana.

Os principais achados desse trabalho foram sobre o perfil metabólico geral com ganho de peso corporal, efeito antidiabético, antiglicante, hipotriglicerolêmico e protetor renal em ratos diabéticos após tratamento crônico com o extrato, efeito antihiperглиcemiante em ratos não diabéticos após sobrecarga de glicose após tratamento agudo com o extrato, efeito hipocolesterolêmico em ratos não diabéticos após tratamento crônico com o extrato.

A fim de reproduzir a sintomatologia do DM, vários estudos têm utilizado modelos experimentais de diabetes induzida por aloxana em ratos, já que, nesses animais desencadeia características clínicas, histológicas e laboratoriais similares ao DM humano (ORLOFF, et al., 1975). Diante desses fatores, o DM aloxânico em ratos foi escolhido para o desenvolvimento desse trabalho.

No presente estudo, foi observado ao longo do período experimental que os grupos diabéticos apresentaram os típicos sintomas do DM descompensado, polifagia, polidipsia e poliúria, mas que não foram quantificadas, estas mesmas características também foram observadas em outros trabalhos (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003). Esses sintomas estão diretamente relacionados à hiperglicemia, já que a poliúria se instala no momento em que o limiar de reabsorção de glicose das células tubulares é ultrapassado, então o excesso de glicose é excretado na urina e a partir do efeito osmótico da glicose, ocorre à diurese osmótica (poliúria). Por conseguinte, a perda de água e eletrólitos pela urina causa desidratação e insuficiência circulatória periférica, em acréscimo, os altos níveis de glicose sanguínea incrementam a hiperosmolaridade sanguínea, estimulando o centro da sede, através de osmorreceptores cerebrais, levando a polidipsia. Já a polifagia, é oriunda da depleção do metabolismo glicídico, prejudicando os mecanismos que levam a síntese de ATP (glicólise, ciclo de Krebs e cadeia fosforilativa de elétrons), diante disso é ativada a lipólise do tecido adiposo a fim de suprir as necessidades energéticas levando a perda de peso

A avaliação da variação de peso nos animais, tabela 2, revelou importante perda de peso corporal em ratos diabéticos de maneira semelhante aos trabalhos de Lerco et al., (2003), Ahmed (2005) e Nagappa (2003). Esses autores afirmam que quanto maior o tempo de induzida e instalada DM, maior será a perda de peso corporal e a debilidade dos animais. Contudo, quando avaliados os ratos diabéticos tratados com o extrato, foi observado ganho de peso corporal, equivalente a quase 50% do que haviam perdido, no período de instalação do DM. Dessa forma, tais resultados revelam que o tratamento com o extrato promove uma evolução ponderal dos animais, por provável melhora do perfil metabólico, em especial, no metabolismo glicídico e lipídico.

A restauração da homeostasia da glicose em indivíduos diabéticos, com total deficiência na secreção de insulina, é promovida por meio de sua reposição. Por conseguinte, são restauradas funções como a inibição da gliconeogênese e da glicogenólise, melhora da captação de glicose periférica e aumento da glicólise. Contribuindo, dessa forma, para a redução da hiperglicemia (FONSECA, 2008).

No diabético, alguns métodos são importantes com a finalidade de avaliar o controle glicêmico, verificando, dessa forma, se os tratamentos empregados para o controle da glicemia estão sendo satisfatórios. Para tal, além das medidas de glicemia de jejum, são realizadas as dosagens de glicemia pós-prandial, medida de glicose na urina, medida de corpos cetônicos na urina, além de frutamina e hemoglobina glicada no sangue (GROSS et al., 2002).

De maneira semelhante à adotada por Lerco et al., (2003), no presente estudo, a confirmação do DM foi confirmada na presença hiperglicemia de jejum no 15º dia após a indução, considerando como ponto de corte a glicemia capilar de jejum superior a 200 mg/dL.

A hiperglicemia crônica observada nos grupos diabéticos estudados nesse trabalho é resultado do severo processo patológico oriundo da deficiência na produção de insulina causada pela ação tóxica e necrótica da aloxana sobre as células β pancreáticas. A avaliação da glicemia de jejum, tabela 3, revelou que nos animais diabéticos não tratados foi bastante superior a dos não diabéticos, caracterizando DM severa, resultados semelhantes foram encontrados por Ahmed (2005) e Nagappa (2003). O tratamento de ratos diabéticos com o extrato exerceu importante ação antidiabética.

O estudo de prospecção do extrato usado nesse trabalho revelou a presença de taninos e flavonóides. É possível que a presença de tais compostos tenha contribuído para a redução da glicemia no grupo diabético tratado com extrato. A literatura afirma que alguns flavonóides apresentam efeitos sobre a produção hepática de glicose (HEMMERLE et al., 1997) e sobre o padrão de absorção intestinal da mesma (JOHNSTON; CLIFFORD; MORGAN, 2003), resultando em um menor índice glicêmico do que o esperado na dieta (CLIFFORD, 1999). Outros trabalhos já relataram vários efeitos benéficos desses compostos sobre parâmetros relacionados ao DM, tais como: redução do pico de glicemia no teste de tolerância oral à glicose (BASSOLI et al., 2008) e redução da glicemia pós-prandial em ratos (SOTILLO; HADLEY, 2002).

Os eritrócitos, células vermelhas do sangue, são células permeáveis a glicose, sendo assim, a hemoglobina fica exposta a concentrações de glicose semelhantes às concentrações plasmáticas. Por conseguinte, a hemoglobina glicada dentro dos eritrócitos vai possuir meia-vida dependente da meia-vida dos eritrócidos. No presente estudo, os animais diabéticos não tratados apresentaram valores de HbA1c aumentados quando comparados com os dois grupos de animais não diabéticos, mas ainda inferiores aos níveis de HbA1c em humanos, isso se deve, provavelmente pelo tempo de indução do DM (1 mês) ou ainda por diferente tempo de meia-vida dos eritrócitos. No entanto, o tratamento com o extrato em animais diabéticos diminuiu os valores de HbA1c, revelando o potencial antiglicante do extrato, gráfico 1. Percentuais HbA1c elevados em ratos diabéticos corroboram com os achados de Ugochukwu, Bagayoko e Antwi (2004). Além disso, Asgary et al., (1999) atribuíram efeitos protetores de flavonóides sobre a glicação da hemoglobina em voluntários saudáveis. Dessa forma, o efeito antiglicante do extrato pode também estar associado à presença de flavonóides em sua composição.

O teste de tolerância oral a glicose no paciente diabético é empregado a fim de avaliar a resistência à insulina, a partir da sobrecarga de glicose e de sua retirada da corrente sanguínea em função do tempo. No presente estudo o teste de tolerância oral a glicose em ratos tratados com o extrato, gráfico 2, revelou importante efeito antihiper-glicemiante, esse resultado indica o possível envolvimento da inibição de enzimas α -glicosidases e/ou do bloqueio de SGLT1 intestinal nos efeitos do extrato, no entanto, mais estudos são necessários como um teste de tolerância intravenoso a glicose e dosagens dos níveis de insulina plasmática em

função do tempo após as administrações de glicose e extrato. No gráfico 2 desse trabalho, não foram apresentados nos resultados os grupos diabético salina e diabético extrato, pois, os ratos não resistiram a esse protocolo experimental, devido a DM severa que apresentaram.

No diabetes o desenvolvimento de dislipidemias é frequente, representando alto risco de doenças cardiovasculares. As alterações mais comumente encontradas são hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, uma vez que a hiperglicemia é o maior determinante na alteração dos níveis totais de VLDL e triglicédeos, com diminuição de HDL (KHAN; ABRAHAM; LEELAMMA, 1995; LEHTO et al., 1997; MITRA et al., 1995). A hipertrigliceridemia ainda está fortemente associada à hipercoagulabilidade, hiperinsulinemia, resistência a insulina e intolerância a glicose (GINGSBERG, 1994).

No presente trabalho, a avaliação do perfil lipídico, tabela 4, revelou que o tratamento com o extrato diminuiu os níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol LDL, em ratos não diabéticos, revelando seu potencial hipocolesterolêmico o que viabiliza um estudo mais detalhado em um modelo experimental de aterosclerose. Esse efeito pode estar relacionado à presença de compostos como flavonóides na composição do extrato, que podem atuar como inibidores de algumas enzimas como a hidróxi-metil glutaril CoA redutase que participa na síntese do colesterol ou reduz a absorção do colesterol no intestino. Pode ainda estar relacionado a presença de saponinas, uma vez que estudos afirmam o potencial hipocolesterolêmico de saponinas (AZMI; QURESHI, 2012; HU et al., 2012).

Com relação às dosagens de VLDL e triglicédeos, a indução do DM revelou importante aumento de seus níveis plasmáticos, resultados semelhantes aos de Lerco et al., (2003), Ahmed (2005) e Nagappa (2003) e o tratamento com o extrato em ratos diabéticos revelou diminuição desses lipídeos plasmáticos, revelando seu potencial hipotriglicerolêmico, assim como nos achados de Ahmed (2005) e Nagappa (2003). Esse resultado além de sugerir o possível mecanismo de ação hipotriglicerolêmica do extrato pode indicar o possível envolvimento, no mecanismo de ação antidiabético do extrato, do estímulo à secreção de insulina, a partir das células β pancreáticas ainda funcionais que não passaram pelo processo de necrose após a administração da aloxana.

Altas concentrações de glicose, cronicamente, favorecem a formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs). A nefropatia diabética revela um espessamento das membranas basais glomerulares, que levam a proteinúria, azotemia, insuficiência renal e, por fim, a falência renal. Nessa situação, o componente genético é importante, mas a exposição de tecidos à hiperglicemia crônica é o principal fator iniciante. Após 30 anos de diabetes, 20% e 44% dos pacientes diabéticos dos tipos 1 e 2, respectivamente, apresentam a nefropatia. Em um estágio inicial a nefropatia diabética é caracterizada por disfunção glomerular e microalbuminúria. Na sequência existe um aumento da proteinúria e uma importante redução da função renal, resultando em uremia (SBD, 2007).

Nessa situação clínica, a membrana basal glomerular, as células mesangiais, os podócitos e as células tubulares renais acumulam altos níveis de AGEs, que por via RAGE (receptores para AGEs) exacerbam a liberação do fator de crescimento β (TGF- β), esses por sua vez, estimulam a síntese de componentes da matriz do colágeno, fenômeno que contribui para o espessamento da membrana basal. Esse acúmulo de AGEs no colágeno da membrana basal, acrescido de sua capacidade de ligação as proteínas plasmáticas, aumenta o efeito de espessamento da membrana basal, o que culmina em alterações na filtração e na perda da função glomerular. A redução da filtração é resultante da compressão dos capilares e da diminuição da superfície de área onde ocorre a filtração, pelo aumento do leito mesangial (SBD, 2007; GARCEZ et al., 2003).

Através das medidas de creatinina e uréia sérica é possível determinar a taxa de filtração glomerular, sendo essa considerada um parâmetro para avaliar a função renal. Uma vez que, na condição diabética a síntese protéica encontra-se diminuída em todos os tecidos, a atividade proteolítica muscular vai estar aumentada. Com isso, há um aumento de afluxo de aminoácidos para o fígado e estes aminoácidos elevam os níveis séricos de compostos nitrogenados como à uréia e creatinina (WHELTON; WATSON; ROCK, 1996).

No presente estudo a repercussão da indução do DM nos níveis de uréia revelou níveis duas vezes superiores nos animais diabéticos, gráfico 3, resultado semelhante ao encontrado por Rodrigues (2010) e pode ter sido ocasionado pelo aumento da proteólise hepática no DM experimental. Quando avaliado o efeito do tratamento com o extrato, os animais diabéticos tratados apresentaram diminuição dos níveis de uréia plasmática, por provável melhora no grau da proteólise hepática

devido ao controle da hiperglicemia, esses resultados são semelhantes aos encontrados por Ahmed (2005) e Nagappa (2003) e revelam o potencial protetor renal do tratamento. Analisando os grupos não diabéticos, o tratamento com o extrato não apresentou alterações, um resultado benéfico que não indica efeitos tóxicos do extrato.

A creatinina é um subproduto oriundo da degradação da creatina e da fosfocreatina, substratos energéticos dos músculos. Vários fatores interferem em sua concentração no sangue: a composição da dieta, a quantidade de massa muscular, o sexo e a capacidade renal em excretar creatinina (SILVA, 2012). Em geral, o aumento da creatinina plasmática ocorre juntamente com o aumento da uréia, no entanto, nesse trabalho não houve diferença estatística, gráfico 4.

Além de várias alterações metabólicas, a hiperglicemia ainda está associada ao desenvolvimento de doenças hepáticas, devido aos mecanismos envolvidos na patogênese da esteatose e do DM, além da resistência à insulina desenvolvida (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2006). O grau de lesão hepática é verificado através da concentração séricas das aminotransferases, já que, sua liberação sanguínea implica em morte celular.

A enzima alanina aminotransferase (ALT) é um melhor indicador para avaliar a integridade celular no fígado quando comparada a aspartato aminotransferase (AST). A utilidade clínica dessas dosagens é devido ao fato de que quando há lesão dos hepatócitos, essas enzimas vazam do citoplasma celular para a corrente sanguínea. No presente estudo, os níveis de ALT se apresentaram aumentados nos grupos diabéticos e o tratamento com o extrato não conseguiu melhorar esse perfil, gráfico 5. Com relação à AST todos os grupos apresentaram-se semelhantes, gráfico 6.

O efeito hepatotóxico encontrado somente nos ratos diabéticos é oriundo da alteração funcional no fígado causado pela aloxana, já que, quando avaliados os animais normoglicêmicos, os quais não foram expostos a aloxana, os níveis das transaminases hepáticas são semelhantes (LEZEN, 2008). A aloxana através da ação de radicais livres produz efeitos tóxicos no pâncreas, rins e fígado, dessa forma, é difícil determinar se a hepatotoxicidade é causada pela hiperglicemia, pelos efeitos tóxicos da aloxana ou pela junção de ambos.

O modelo experimental de DM tem sido utilizado no estudo da neuropatia diabética, assim como, suas repercussões sobre o sistema cardiovascular. No

presente estudo, a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, gráfico 7, a indução do DM apresentou diminuição na PAM, PA sistólica, PA diastólica e FC dos ratos. O tratamento com o extrato diminuiu a PA sistólica em ratos diabéticos, diminuiu ainda a FC em ratos não diabéticos, revelando assim seu potencial bradicardico, tais resultados viabilizam um estudo melhor detalhado dos efeitos agudos e subcrônicos sobre os parâmetros cardiovasculares.

Alguns estudos que avaliaram parâmetros cardiovasculares, em ratos diabéticos, usando técnicas de medidas diretas demonstraram redução na PAM, PA sistólica, PA diastólica e FC nos grupos de ratos diabéticos em diferentes tempos de diabetes experimental (MAEDA et al., 1995; DALL'AGO et al., 1997; DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2000).

A diminuição da PA sistólica observada no presente trabalho pode estar relacionado à redução no desempenho ventricular em ratos diabéticos. É possível que alterações no débito cardíaco, produzidas pela queda da FC (efeito cronotrópico negativo), bem como pela redução da contratilidade ventricular (efeito inotrópico negativo), tenham contribuído para redução da PA em animais diabéticos, uma vez que, a PA relaciona-se diretamente com o débito cardíaco.

Estudos têm demonstrado redução do tônus vagal e manutenção do tônus simpático para o coração, avaliados pelo bloqueio farmacológico com propranolol e atropina, respectivamente (MAEDA et al., 1995; DE ANGELIS et al., 2000), sugerindo a presença de neuropatia vagal cardíaca. A bradiardia de repouso observada em animais diabéticos tem sido atribuída a alterações no nodo sinoatrial com conseqüente redução da FC (DE ANGELIS; IRIGOYEN; MORRIS, 2000) embora alterações nos mecanismos colinérgicos não possam ser excluídos com uma causa.

De maneira distinta, Sabino-Silva et al., (2010), não encontrou diminuição nos parâmetros cardiovasculares de PAM, PA sistólica e PA diastólica. Somente a FC se mostrou diminuída estatisticamente em ratos diabéticos após um mês de indução por aloxana. Tal disparidade com os resultados encontrados nesse trabalho, provavelmente se deve a diferença de severidade do DM entre os dois trabalhos. Alguns trabalhos observaram aumento de PA em animais diabéticos, provavelmente por terem usado técnicas indiretas de medida de PA, pletismografia de cauda (KAWASHIMA et al., 1978.; BUNÑAG; TOMIDA; SASAKI, 1982; FEIN et al., 1991; TAKED et al., 1991). Nesse caso, o aumento do tecido fibroso na cauda dificulta a

oclusão da artéria caudal induzindo erros sistemáticos na medida da PA (CARRIER; ARONSTAN, 1987).

Por fim, o uso de plantas medicinais baseadas no conhecimento popular nas diferentes culturas, a fim de aliviar sintomas e prevenir algumas doenças ou distúrbios fisiológicos tem sido um ponto de início para o desenvolvimento de pesquisas etnofarmacológicas.

Por meio de estudos semelhantes ao apresentado, pode-se contribuir para o emprego correto de plantas medicinais pela população para fins terapêuticos, através da comprovação da eficácia e segurança terapêuticas das plantas. Além disso, tais resultados contribuem para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos protótipos.

A Organização Mundial de Saúde junto com a política nacional práticas integrativas e complementares do SUS incentivam, à utilização de plantas medicinais como coadjuvantes no tratamento de diversas patologias. Além da importância do conhecimento do potencial da flora brasileira para a produção de fitofármacos, contribuindo desta forma para a obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos, além de viabilizar o estudo farmacológico da planta em questão.

8 CONCLUSÃO

No estudo das ações do tratamento com o extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *Terminalia catappa* em ratos diabéticos, pode-se concluir que o extrato apresenta efeito antidiabético, antiglicante, hipotriacilglicerolêmico e protetor das lesões renais causadas pelo diabetes. Em ratos não diabéticos o extrato apresenta efeito hipocolesterolêmico e bradicárdico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABESUNDARA, K. J. M.; MATSUI, T.; MATSUMOTO, K. Alpha-glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong anti-hyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2541-2545, 2004.
- ADDISON, D.; AGUILAR, D. Diabetes and Cardiovascular Disease: The Potential Benefit of Incretin-Based Therapies. **Curr Atheroscler Rep.**, v. 13, n. 2, p. 115–122, 2011.
- AHMED, S. M. et al., Anti-Diabetic Activity of Terminalia catappa Linn. Leaf Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Iranian journal of pharmacology & therapeutics**, v. 4, n.1, p. 36-39, 2005.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Introdução à Etnobotânica**. 2. ed. Recife: Bagaço, 2002, p.17-27.
- AL-WAILI, N. S. Treatment of diabetes mellitus by Artemisia herba-alba extract: preliminary study. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 13, n. 7, p. 569-573, Jul. 1986.
- ANKLI, A. et al., Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 43-52, 2002.
- ARAÚJO, D. S., CHAVES, M. H. Triterpenóides pentacíclicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*. **Quimica Nova**, v.28, p. 996-999, 2005.
- ARAÚJO, J. R.; MARTEL, F. Regulação da absorção intestinal de glicose: uma breve revisão. **Arquivos de medicina**, n. 23, v. 2, p. 35-43, 2009.
- ARONSON, D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. **Adv. Cardiol.**, v. 45, p. 1-16, 2008.
- ASGARY, S. et al., Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. n. 73, v. 1, p. 223–6, 1999.
- ATKINSON, M. A.; LEITER, E. H. The NOD mouse model of type 1diabetes: As good as it gets? **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 601-604,1999.
- AZMI, M. B.; QURESHI, S. A. Methanolic Root Extract of Rauwolfia serpentina Benth Improves the Glycemic, Antiatherogenic, and Cardioprotective Indices in Alloxan-Induced Diabetic Mice. [Adv Pharmacol Sci](#), v. 20, n. 12, 2012.
- BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. **Rev. Nutr.**, v. 18, n. 3, p. 377-389, 2005.

BARRETT, M. L.; UDANI, J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutr J.**, v. 10, p. 24-31, 2011.

BASSOLI, B. K. et al., Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: Effects on hepatic glucose release and glycaemia. **Cell Biochemistry and Function.** v. 23, n. 3, p. 320-8, 2008.

BEM, A. F.; KUNDE, J. The importance of glycated hemoglobin determination in the management of chronic complications associated with diabetes mellitus. **Bras Patol Med Lab.** Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 185-191, jun. 2006.

BERTOLUCI, M. C. et al., Disfunção endotelial no diabetes mellitus tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, p. 416-427, 2008.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste especialmente do Ceará.** 3ª ed. Fortaleza, 1976, 177 p.

BUÑAG, R. D.; TOMIDA, T., SASAKI, S. Streptozotocin diabetic rats are hypertensive despite reduced hypothalamic responsiveness. **Hypertension**, v. 4, p. 556-565, 1982.

CARRIER, G.O.; ARONSTAM R.S. Altered muscarinic receptor properties and function in the heart in diabetes. **J Pharmacol Exp Therap.**, v. 242, p. 531-535, 1987.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 18, p. 60-64, 2003.

CHEN, P. S. et al. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters**, v.152, p.115-122, 2000.

CHYAU, C. C. et al. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Chemistry**, v.78, p.483-488, 2002.

CHYAU, C. C., KO, P. T., MAU, J. L. Antioxidant properties of aqueous extracts from *Terminalia catappa* leaves. **LWT- Food Science and Technology**, v.39, p.1099-1108, 2006.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, 2. ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 93.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 79, p. 362-72, 1999.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**, 2. ed. Civilização Brasileira, 1982, p. 48.

DALL'AGO, P. et al. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 119-124, 1997.

DAVIS, S. N. Insulina, agentes hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2007. Cap. 60, p. 1459-1488.

DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C.; MORRIS, M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. **Auton Neurosci**, v. 28, n. 145, p. 1-16, jan. 2009.

DELARCHE, F. H. Is pancreas development abnormal in the nonobese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 437-47, 2001.

DI STASI, L. C. (Org). **Plantas Medicinais: arte e ciência**. Unesp, São Paulo, p. 15-68. 1996.

EISENMAN, S. W. et al. Qualitative variation of anti-diabetic compounds in different tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) cytotypes. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1062-1074, 2011.

ENGLYST, K. N.; ENGLYST, H. N. Carbohydrate bioavailability. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 1-11, 2005.

FAN, Y. M. et al. Phytochemical and anti-inflammatory studies on *Terminalia catappa*. **Fitoterapia**, v.75: p.253-260, 2004.

FEIN, F.S. et al., Myocardial adaptation to chronic propranolol therapy in diabetic rats. **J. Cardio Pharmacol.**, v. 260, p. 647-649, 1991.

FONSECA, F. A. H.; Síndrome metabólica sem obesidade central: mito ou realidade? **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 15, n. 3, p. 168-9, 2008.

GAO, J. et al. Inhibitory effect of TCCE on CCl4-induced overexpression of IL-6 in acute liver injury. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.36, p. 767-772, 2004.

GARCEZ, F. R. et al. Triterpenoids, lignans and flavans from *Terminalia argentea* (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.229-232, 2003.

GINGSBURG, H. N. Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. **Medicinal and Clinical North America**. v. 78, p. 1-20, 1994.

GOORDAZI, M. O. et al. Fasting insulin reflects heterogeneous physiological processes: role of insulin clearance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 301, n. 2, p. 402-408, 2011.

GOUN, E. et al., Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plantas. **Fitoterapia**, v.76, p.592-596, 2003.

GROSS, D. J., et al. The immunomodulator Linomide: role in treatment and prevention of autoimmune diabetes mellitus. **Int. Immunopharmacol**, v. 1, p. 1131-1139, 2001.

GROSS, J. L. et al., Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GROVER, J. K. et al. Traditional Indian anti-diabetic plants Attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **J. ethnopharmacol.**, v. 76, p. 233-236, 2001.

HEMMERLE, H. et al., Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. **Journal of Medicine Chemistry**. v. 40, n. 2, p.137-45, 1997.

HERNANDORENA, B.H.; GONZALES, J. C. R.; GARCIA, J. C. R. Animales de Laboratorio en la Endocrinología: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. **Revista cubana de endocrinología**, v. 12, n. 3, p. 168-77, 2001.

HU, X. Q. et al. Effects of bioactive components of sea cucumber on the serum, liver lipid profile and lipid absorption. [Biosci Biotechnol Biochem.](#), v. 23, n. 76, p. 2214-2218, 2012.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 78, n. 4, p. 728-33, 2003.

KAMESWARA RAO, K. B.; KESAVULU, M. M.; APPARAO C. Antihyperglycemic activity of *Mormodica cymbalaria* in alloxan diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 78, p. 67 –71, 2001.

KANTERS, S. D. et al. Incidence and determinants of mortality and cardiovascular events in diabetes mellitus: A meta-analysis. **Vascular Médica**, v. 4, p. 67-75, 1999.

KASABRI, V., FLATT, P. R., ABDEL-WAHAB, Y. H. A., *Terminalia bellirica* stimulates the secretion and action of insulin and inhibits starch digestion and protein glycation *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.103, p.212-217, 2010.

KAWASHIMA, H., et al., Chronic hypertensin induced by streptozotocin in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.305, p. 123-126, 1978.

- KHAN, B. A.; ABRAHAM, A.; LEELAMMA, S. Hypoglycemic action of *Murray Koenigii* (curry leaf), *Brassica juncea* (mustard); mechanism of action. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v. 32, p. 106– 8, 1995.
- KHAN, M. R., KIHARA, M., OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Terminalia complanata* and *Flacourtia zippelii*. **Fitoterapia**, v.73, p.737-740, 2002.
- KORKMAZ, H.; GÜRDAL, A. Effect of *Artemisia santonicum* L. on blood glucose in normal and alloxaninduced diabetic rabbits. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 675-676, 2002.
- KUMAVAT, U. C.; SHIMPI, S. N.; JAGDALE, S. P. Hypoglycemic activity of *Cassia javanica* Linn. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **J Adv Pharm Technol Res.**, v. 3, n. 1, p. 47–51, 2012.
- LEHTO, S. et al. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**. v. 46, n. 8, p. 1354-9, 1997.
- LEITER, E. H.; HERRATH, M. V. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. **Diabetologia**, v. 47, p. 1657-1660, 2004.
- LENZEN, S. The mechanism of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**. v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.
- LENZEN, S.; PANTEN, U., Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**. v. 31, n. 6, p. 337-342, 1988.
- LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxa em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.** v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.
- LI, X. et al. SOD1 overexpression in vivo blocks hyperglycemia-induced specific PKC isoforms-substrate activation and consequent lipidperoxidation in diabetic embryopathy., **Am J Obstet Gynecol.**, v. 205, n. 1, p. 84-86, 2012.
- LIN, Y. L. et al., Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.47, p.253-256, 2000.
- LINO, C.S. et al. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.1, p.125-7, 2004.
- LOGENDRA, S. et al. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracuncululus*. **Phytochem**, v. 67, p. 1539-1546, 2006.
- LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 304-330, 1948.
- MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquiv. Bras. Endoc. Metab.**, v. 50, n. 2, abr. 2006.

MAEDA C.Y., et al., Streptozotocin diabetes changes arterial pressure and baroreflex sensitivity in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 497-501, 1995.

MALKANI, S.; MORDES, J. P. The implications of using Hemoglobin A1C for diagnosing Diabetes Mellitus. **Am J Med.**, v. 125, n. 5, p. 395-401, 2011.

MANSI, K.; LAHHAM, J. Effects of *Artemisia sieberi* Besser (*A. herba-alba*) on heart rate and some hematological values in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, n. 2, p. 57-62, 2008.

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

MAROO, J. et al. Glucose lowering effect of aqueous extract of *Encostemma littorale* Blume in diabetes: a possible mechanism of action. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 317 –320, 2002.

MAROO, J.; VASU, T. V.; GUPTA, S. Dose dependent hypoglycemic effect of aqueous extract of *Encostemma littorale* Blume in alloxan induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 10, p. 196 – 199, 2003.

MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry**. v.24, p. 639-652, 1985.

MARTINS, B. A. L. Insulina, glucagon e diabetes melito. In: GUYTON, A.C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. Cap. 78, p. 961-976.

MÉNDEZ, J. D. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. **Gac. Méd. Méx.**, v. 139, p. 1, 2003.

MENEZES, F. S. et al., Hypoglycemic activity of to *Bauhinias* species: *Bauhinia forticata* L. and *Bauhinia monandra* K. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**, Fonseca, C. D., 1. ed. 2001.

MIURA, T. et al. Suppressive activity of the fruit of *Momordica charantia* with exercise on blood glucose in type 2 diabetic mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 248-250, 2004.

MITRA, S.K. et al., Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated haemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 33, p. 798–800, 1995.

MURALI, B.; UPADHYAYA, U. M.; GOYAL, R. K. Effect of chronic treatment with *Encostemma littorale* in non-insulin dependent diabetic (NIDDM) rat. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 199-204, 2002.

NAGAPPA, A. N. et al., Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 45–50, 2003.

ORLOFF, M. J. et al. Long-term studies of pancreas transplantation in experimental diabetes mellitus. **Annals of Surgery**. v. 182, p. 198-206, 1975.

PADDU, A. et al. Vascular endothelial growth factor-C secretion is increased by advanced glycation end-products: possible implication in ocular neovascularization. **Mol Vis.**, v. 19, p. 2509–2517, 2012.

PARI, L.; LATHA, M. Antidiabetic activity of *Cassia auriculata* flowers: effect on lipid peroxidation in streptozotocin diabetes rats. **Pharm. Biol.**, v. 40, p. 512- 517, 2002.

PEPATO, M.T. et al. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, n.2, p.191-7, 2002.

PIETROVSKI, Eveise Fernandes. **Avaliação da atividade antinoceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos obtidos das flores de *Combretum leprosum* Mart.** Curitiba, 2004. 71p. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PONUGOTI, B.; DONG, G.; GRAVES, D. T. Role of Forkhead Transcription Factors in Diabetes-Induced Oxidative Stress. **Exp Diabetes Res.**, v. 20, n. 12, p. 122-129, 2012.

PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V. P. *Syzygium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **J. Ethnopharmacol.**, v. 84, p. 205-209, 2003.

RADER, D. J. High-density lipoprotein metabolism as a therapeutic target for atherosclerosis. **Cardiology Rounds**, v. 6, n. 10, p. 302-321, 2002.

RAMANA, K. V. Aldose reductase: New Insights for an Old Enzyme. **Biomol Concepts.**, v. 2, n. 2, p. 103–114, 2011.

RAO, B. K. et al. A. Antidiabetic activity of *Terminalia pallida* fruit in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.169-172, 2003.

RAO, B. K.; RAO, A. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Syzygium alternifolium* (WT) Walp. Seed extracts in normal and diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 8, p. 88 – 93, 2001.

RATHI, S. S.; GROVER, J. K.; VATS, V. The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 236-243, 2002.

RATHI, S. S. et al. Prevention of experimental diabetic cataract by Indian Ayurvedic plant extracts. **Phytother. Res.**, v. 16, p. 774- 777, 2002.

RIBNICKY, D. M. et al. Improved absorption and bioactivity of active compounds from an anti-diabetic extract of *Artemisia dracuncululus* L. **Int J Pharm.**, v. 92, p. 370-387, 2009.

RODRIGUES, P. A. L. **Análise da evolução de parâmetros bioquímicos do sangue e de alterações dentárias em ratos diabéticos sob a ação terapêutica do chá-verde**. 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade de São Paulo-USP. Bauru, 2010.

RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic α - and β -cells in health and disease. **Cell Calcium**, v. 51, n.3, p. 300–308, 2012.

SABINO-SILVA, R. et al. The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy. **Braz J Med Biol Res.**, v.43, n. 11, p. 1019-1026, 2010.

SABU, M. C., KUTTAN, R., Antidiabetic and antioxidant activity of *Terminalia bellerica* Roxb. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, p.270-275, 2009.

SABU, M. C.; SUBBURAJU, T. Effect of *Cassia auriculata* Linn on serum glucose level, glucose utilization by isolated rat hemidiaphragm. **J. Ethnopharmacol.**, v. 80, p. 203-206, 2002.

SAID, O. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Jurnal of Ethnopharmacological**. v. 83, n. 3, p. 251-265, 2002.

SCOBIE, I. N. **Atlas of Diabetes Mellitus**. 3.ed. London: Informa healthcare, 2007.

[SEFI, M.](#) et al, *Artemisia campestris* leaf extract alleviates early diabetic nephropathy in rats by inhibiting protein oxidation and nitric oxide end products. [Pathol Res Pract.](#), v. 208, n. 3, p. 157-162, Mar. 2012.

SEINO, S.; SHIBASAKI, T.; MINAMI, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. **J Clin Invest.**, v. 121, n. 6, p. 118–2125, 2011.

SENANAYAKE, G. V. K. et al. The effects of bitter melon (*Momordica Charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 257-262, 2004.

SILVA, K. A. S. et al. Previous Exercise Training Has a Beneficial Effect on Renal and Cardiovascular Function in a Model of Diabetes. **PLoS One.**, v. 7, n. 11, 2012.

SILVA, F. R. M. B. et al., Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 33-37, 2002.

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

- SIMÕES, C. M. O., et al., **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Saraiva, 2003.
- SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 74-77, 2005.
- SHU, A. D., et al. Farmacologia do pâncreas endócrino. In: GOLAN, D. E., et al., **Princípios de farmacologia – a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009. Cap. 29, p. 493-509.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: **tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus**. Rio de Janeiro: SBD, 2007.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. 3. ed. Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.
- SOTILOO, D. V. R.; HADLEY, M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: cholesterol, triacylglycerol, and minerals in (fa/fa) Zucker rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 12, p. 717-26, 2002.
- STOJANOVIC, V.; ILHE, S. Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: A review. **Can Vet J.**, v. 52, n. 4, p. 426–430, 2011.
- STÖCKLI, J.; FAZAKERLEY, D. J.; JAMES, D. E. GLUT4 exocytosis. **J Cell Sci.**, v. 15, n. 24, p. 4147–4159, 2011.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, n. 6, p. 536-546, 2001
- SZKUDELSKI, T.; KANDULSKA, K.; OKULICZ, M. **Alloxan in vivo does not only exert deleterious effect on pancreatic B cells**. *Physiology Research*, v. 47, n. 5, p. 343-346, 1998
- TABIT, C. E. et al. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. **Rev Endocr Metab Disord.**, v. 11, n. 1, p. 61–74, 2010.
- TANG, X. et al. Effective protection of *Terminalia catappa* L. leaves from damage induced by carbon tetrachloride in liver mitochondria. **Journal of nutritional Biochemistry**, v. 17, p.177-182, 2006.
- TAKED Y. et al. Production of endothelin-1 from the mesenteric arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 48, p. 2553-2556, 1991.
- UGOCHUKWU, N. H.; BAGAYOKO, N. D.; ANTWI, M. E. The effects of dietary caloric restriction antioxidant status and lipid peroxidation in mild and severe streptozotocin-induced diabetic rats, **Clinica Chimica Acta**. v. 348, n. 1, p. 121–9, 2004.

[UPADHYAY, U. M.](#); [GOYAL, R. K.](#) Efficacy of *Encicostemma littorale* in Type 2 diabetic patients. [Phytother Res.](#), v. 18, n. 3, p 233-235, 2004.

VERMA, L. et al. Antidiabetic activity of *Cassia occidentalis* (Linn) in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Indian J Pharmacol.**, v. 42, n. 4, p. 224–228, 2010.

VIKRANT, V. et al. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 139-143, 2001.

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

ZANOELLO, A. M. et al. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra *diabetes mellitus* induzido por aloxano em ratos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 1, p. 31-36, 2002.

ZHENG, Y. et al. Mechanisms of Glucose Uptake in Intestinal Cell Lines: Role of GLUT2. **NIHPA manuscripts**, v. 151, n. 1, p. 13-25, 2012.

YADAVA, R. N.; RATHORE K. A new cardenolide from the seeds of *Terminalia arjuna*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 2, n. 2, p.97-101, 2000.

YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. DNA strand breaks in pancreatic islets by in vivo administration of alloxan or streptozotocin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 103, n. 3, p. 1014-1020, 1981.

WANG, Z. Q. et al. An extract of *Artemisia dracuncululus* L. enhances insulin receptor signaling and modulates gene expression in skeletal muscle in KK-Ay mice. **J Nutr Biochem.**, v. 22, p. 71-78, 2011.

WHELTON, A.; WATSON, A. J.; ROCK, R. C. Metabólitos Nitrotenados e Função Renal. : In: Burtis CA, Ashwood ER. **Fundamentos de química clínica.** 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p. 553-74.

WRIGHT, E. M.; TURK, E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. **Pflügers Arch.**, v. 447, n. 5, p. 510-518, 2004.