

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO
NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

LIDIANI FIGUEIREDO SANTANA

**EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE CAGAITEIRA
(*Eugenia dysenterica* DC.) EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS INDUZIDOS
POR ESTREPTOZOTOCINA**

Campo Grande

2016

LIDIANI FIGUEIREDO SANTANA

**EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE CAGAITEIRA
(*Eugenia dysenterica* DC.) EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS INDUZIDOS
POR ESTREPTOZOTOCINA**

Defesa apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Campo Grande

2016

LIDIANI FIGUEIREDO SANTANA

**EFEITOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE CAGAITEIRA
(*Eugenia dysenterica* DC.) EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS INDUZIDOS
POR ESTREPTOZOTOCINA**

Defesa apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós Graduação em
Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-
Oeste da Universidade Federal do Mato
Grosso do Sul

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o
conceito _____.

Campo Grande, 17 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

Karine de Cássia Freitas Gielow – CCBS – UFMS (coordenador)

Rita de Cássia Avellaneda Guimarães – CCBS – UFMS

Elisvânia Freitas dos Santos – CCBS – UFMS

Danielle Bogo – CCBS – UFMS (Suplente)

AGRADECIMENTOS

Deus é o dono de tudo. Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar aonde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm essa oportunidade. Ele a deu para mim, não sei por quê. Sei que não poderia desperdiçá-la. Foi difícil, cansativo, muitas vezes pensei em “sair correndo”, mas ele sempre me deu forças, paciência e simplicidade para entender as dificuldades e continuar seguindo em frente. E posso afirmar, com toda a certeza, que aproveitei essa oportunidade. E sempre direi Amém à todas as oportunidades que Deus colocar em minha vida. Obrigada.

Minha família é maravilhosa. Ela é uma das oportunidades que Deus me deu que nunca vou desistir e muito menos deixar para trás. Meus pais são minha inspiração e meu orgulho. Meu pai, Toninho, já falecido, sempre dizia a minha mãe “Nossos filhos tem que estudar!!!”. Deus o levou antes, mas sei que de onde quer que esteja, está acompanhando minha jornada e feliz pelas minhas conquistas. Já a minha mãe, dona Rozeli, é tudo pra mim. Se existe uma pessoa que tenho que agradecer todos os dias, é ela. Paciente, preocupada, cuidadosa, escuta eu reclamar, chorar, brigar, e sempre me consola, me mostra o melhor caminho. Como também me ajudou em praticamente todos meus experimentos desde a graduação. E meus irmãos, as duas pessoas mais lindas desse mundo. Somos extremamente diferentes, brigamos frequentemente, mas amo tanto que não consigo ficar um dia sem incomodar. A Diana, é muito inteligente, quero ser igual à ela quando crescer, me ajudou muito nos experimentos do mestrado, me atendia em qualquer horário para tirar minhas dúvidas, me ensinou todos os passos para realizar o experimento com sucesso. O Murilo foi explorado fisicamente em todos meus experimentos, ficava bravo às vezes, mas passava rápido, é meu companheiro e me protege. Não podia deixar de agradecer meu cunhado, Cassiano, desde que me conheço por gente ele está na família, ele não precisa fazer nada pra mim, só de cuidar e amar minha irmã como ele sempre fez já fico feliz e agradecida. Se não fosse essa união, não teríamos hoje o anjo que Deus enviou a nossa família, Lara, minha sobrinha querida, foi minha companheira várias vezes para ir ao biotério aos finais de semana na graduação, e agora Deus está nos premiando novamente com a Heloisa, que é amada por todos nós desde o dia que recebemos a notícia de sua existência. Minha família é tudo que tenho e tudo que mais amo, só tenho que agradecer cada um deles por tudo, o laço que existe entre nós é muito forte. Obrigada, obrigada e obrigada.

E como não agradecer a professora Karine, nem todas as palavras bonitas do universo em diversas línguas diferentes não traduziria o que ela representou e representa em minha vida. Deu-me oportunidade na graduação acompanhar trabalhos experimentais, e foi daí que surgiu meu primeiro projeto com animais, sob sua orientação. Em seguida me abandonou na UFGD, mas como sou muito insistente, vim atrás, e atualmente me orienta no mestrado. Muito obrigada professora, pelas trocas de conhecimentos, por tudo que me ensinou, pelas reuniões para discutirmos e decidirmos juntas o que seria realizado no trabalho, aprendi muito. Obrigada pela sua dedicação, preocupação, companheirismo, não apenas com os assuntos acadêmicos, como também por participar dos problemas pessoais, e me ouvir sempre. Considero a senhora professora e amiga, pois qual professor que se lembra de levar para as reuniões uma banana extra como lanche porque sabe que sua orientada é morta de fome?! Espero ter sido a orientada que desejava, que nunca tenha te decepcionado ou causado algum aborrecimento. Está em meu coração e espero que sejamos companheiras de pesquisa por muitos anos ainda. Obrigada.

Agradeço também a professora Fabíola, minha orientadora do TCC, e atualmente coorientadora do mestrado. Agradeço à ela por ter acreditado no meu esforço. Havia assumido o concurso como professora na universidade por alguns meses e topou me orientar sem saber se eu era uma aluna “bucha”. Obrigada professora, me ensinou muito, desde a escrita, estatística, como também em procedimentos experimentais. Ensinou-me a ser crítica e exigente, a questionar e não acreditar em tudo que me falam. Obrigada, Deus soube escolher minhas orientadoras, e está em meu coração assim como a professora Karine, que sejamos todas companheiras de pesquisa.

Quando cheguei à UFMS, a sensação que tive é que iria estar sozinha, cidade nova, pessoas novas, primeira aluna orientada pela professora Karine no mestrado com nutrição experimental. Foi quando conheci a Bruna, orientada de TCC da professora, falei tanto naquele dia, acho que até assustei a moça, queria muito que ela gostasse de mim. Hoje é minha melhor amiga. Se a Bruna não estivesse comigo nesses dois anos, não sei o que seria dos meus experimentos. Obrigada é pouco para tudo que ela fez. Ia ao biotério ou ao DTA qualquer hora, para fazer qualquer coisa. Muito obrigada por tudo. Sabe que pode contar comigo. Obrigada.

Depois apareceu Sandramara, coitada, sou tão abusada que explorei Sandra em todos os sentidos da palavra. A primeira vez que nos encontramos achei sinceramente que ela sim seria uma aluna bucha, mas não, me surpreendeu e me surpreende a cada dia

com seu esforço, dedicação, sabedoria. Sandra em pouco tempo tornou-se uma grande amiga, me socorreu nos experimentos e nos problemas pessoais, me abrigou em sua residência por dias sem cobrar nada em troca. Mesmo com seu jeito delicado-desastrado se entregou de coração aos experimentos. Além disso, faz o tereré mais *top* da cidade. Acredito que ela nem imagina o quanto é importante nossa amizade. Muito obrigada.

E o que seria uma pesquisa sem uma equipe, a minha não foi diferente, tenho e devo agradecer muitas pessoas que fizeram parte do trabalho e sem elas esse projeto não teria chegado ao fim. Muito obrigada professor Arnildo Pott e Flavio Macedo, que fizeram a identificação da planta, me levaram até os pés de cagaita e me ajudaram a coletar. Obrigada professora Claudia da UEMS, por ter elaborado o extrato de uso neste projeto. Tenho amigas maravilhosas, como não agradecer a Gabi, Babi, Camila, Érica, Priscila, Fernanda e Vivian, que me ajudaram em todos os experimentos, tanto na coleta como nas análises posteriores, foram comigo em finais de semana no biotério para não ir sozinha, como também à noite para colocar os animais de jejum. E os professores, Elisvania, Rita, Geovana, Ana Rita, que me ajudou a calcular doses, realizar análises, correções na parte metodológica, muito obrigada. Como não se lembrar dos técnicos, Dani que me ajudava nos experimentos e a fazer as rações, Adriana nossa veterinária, e a Ingridi, “super ‘coletadora’ de sangue ocular”. Muito obrigada, vocês fizeram parte de uma fase importante de minha vida, e é uma alegria ter passado esses momentos com todos. Amo cada um e sou muito grata pelo companheirismo. Obrigada.

Quero agradecer aos amigos que ficaram de longe, participando indiretamente dessa etapa, a Mariana, Thaisa, Ingrid e Kennyson, me incentivaram e sempre estiveram presentes. Obrigada.

Também quero agradecer os funcionários da UFMS em geral, aos seguranças que permitiam minha entrada no campus; da manutenção, que cuidavam para o bom funcionamento do ar condicionado, *timers*, alarmes, entre outros; os funcionários da limpeza, que deixavam o ambiente em condições adequadas para trabalhar com animais. Enfim, todos aqueles que colaboravam para zelar o patrimônio assim como proporcionar condições adequadas para o experimento ser executado com sucesso. Obrigada.

Agradeço todos os animais, que cederam suas vidas em prol do desenvolvimento da pesquisa. Garanto que cuidei deles com muito amor e realizei todos os procedimentos evitando estresse ou morte. Muito obrigada.

Também quero agradecer a FUNDECT e CAPES pelo apoio financeiro.
Obrigada.

Muito obrigada!!!

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato etanólico das folhas de cagaiteira em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). As folhas foram coletadas em duas localidades do município de Campo Grande – MS. Para a obtenção do extrato etanólico, a amostra foi acondicionada para extração com solução aquosa de etanol na proporção de 1:3 (m.m-1) folha:solução de etanol. O ensaio de atividade antioxidante por β -caroteno/ácido linoleico foi realizado através da inibição da peroxidação lipídica e também foi realizada a quantificação de fenóis, e análise fitoquímica. Para o teste de toxicidade foram utilizados ratos *Wistar*, fêmeas distribuídas em 2 grupos (n=5): controle que recebeu salina (1mL/Kg), e grupo tratado com extrato etanólico das folhas da cagaiteira na dose de 2000mg/kg. Os animais foram deixados em jejum por 4 horas. Em seguida administrado (*gavagem*) salina ou extrato, e observado seu comportamento aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a administração por meio do “*screnning*” hipocrático. Para o modelo de diabetes foram utilizados camundongos *Swiss*, machos (6 semanas). A indução foi realizada através de injeção i.p. de STZ (150mg/kg). Após 7 dias, confirmado o diabetes (glicemia de jejum > 250 mg/dL), os animais foram distribuídos nos grupos experimentais: controle normal tratado com salina (CTL SAL), controle diabético tratado com salina (STZ SAL), controle diabético tratado com metformina (500mg/kg) (STZ MET), e os demais tratados com extrato etanólico nas doses 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal (*gavagem*) por 21 dias. Foram avaliados a glicemia, consumo alimentar e hídrico semanalmente; ao final foi realizado a eutanásia por exsanguinação, coletado sangue para análises bioquímicas, e o pâncreas e fígado para análise histológica. Dentre os resultados obtidos, a atividade antioxidante β -caroteno/ácido linoleico, com o Radical Livre, flavonoides totais e os fenóis totais, apresentaram os valores aproximados de: 113, 107, 147 e 204, respectivamente; e na análise fitoquímica identificou quercetina e ácido gálico. Em relação ao teste de toxicidade aguda e “*Screening*” Hipocrático o extrato não causou nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais analisados em relação aos animais tratados com salina. No modelo de diabetes, observou-se que na ingestão alimentar, os grupos EEC 50 e EEC 100 apresentou valor semelhante ao STZ MET, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,001$); já com relação à ingestão hídrica, quanto maior a concentração da dose do extrato, menor o consumo ($p < 0,001$). O ganho de peso dos animais dos grupos STZ SAL e EEC 100 apresentou diminuição significativa em relação ao peso dos animais dos grupos CTL SAL, STZ MET, EEC 25 e EEC 50. Não houve melhora na glicemia de jejum nos grupos tratados, bem como no colesterol total; no entanto, o HDL-colesterol dos grupos STZ MET e EEC 25 aumentou quando comparados aos demais ($p < 0,05$). Já o LDL-colesterol reduziu nos grupos STZ MET e EEC 25 ($p < 0,001$). O VLDL esteve aumentado no STZ SAL quando comparados com os demais grupos ($p < 0,001$), o mesmo aconteceu com os triglicérides. Na histologia do fígado os grupos EEC 25 e EEC 50 mantiveram a

integralidade do tecido hepático, e a histologia do pâncreas, o grupo EEC 25 apresentaram ácinos pancreáticos típicos com ilhota de Langerhans típica. Conclui-se, nessas condições experimentais, o extrato etanólico das folhas da cagaiteira não influenciou os níveis glicêmicos, no entanto, beneficiou o perfil lipídico com potencial para tratamento de dislipidemias.

Palavras-Chave: *Eugenia dysenterica* DC., *diabetes mellitus*, dislipidemia, camundongos.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the effects of ethanol extract from cagaiteira leaves in diabetic mice induced by streptozotocin (STZ). The leaves were collected from two locations in Campo Grande - MS. For obtaining the ethanol extract, the sample was stored for the extraction with aqueous ethanol in the ratio of 1: 3 (M. M-1) sheet: ethanol solution. The antioxidant activity assay for β -carotene / linoleic acid was carried out through inhibition of lipid peroxidation was also performed and the quantification of phenols and phytochemical analysis. For the toxicity test Wistar rats, females divided into 2 groups (n=5): control that received saline (1ml/kg) and group treated with ethanolic extract of leaves cagaita at a dose of 2000mg/kg. The animals were fasted for 4 hours. In then administered (gavage) or saline extract, and their behavior observed at 30, 60, 120, 240 and 360 minutes after the administration by means of "screening" hippocratic. To the diabetes model mice used were male Swiss (6 weeks). Induction was performed by injecting i.p. STZ (150 mg/kg). After 7 days, confirmed diabetes (fasting glucose >250mg/dL), the animals were divided into experimental groups: normal treated with saline control (SAL CTL), diabetic control treated with saline (SAL STZ) diabetic control treaty with metformin (500mg/kg) (STZ TEM), and the other treated with ethanolic extract at doses 25, 50, 100 mg/kg body weight (gavage) for 21 days. They evaluated blood glucose, food and water consumption weekly; was performed at the end sacrificed by exsanguination, the blood collected for biochemical analysis and the liver and pancreas for histological analysis. Among the results, the β -carotene / linoleic acid antioxidant, with the Free Radical, total flavonoids and phenolic compounds, presented the approximate values: 113, 107, 147 and 204, respectively; and phytochemical analysis identified quercetin and gallic acid. Regarding the acute toxicity test and "Screening" Hippocratic the extract did not cause any changes in behavioral parameters analyzed in relation to the animals treated with saline. In the diabetes model, it was observed that food intake, the EEC 50 and EEC 100 groups presented values similar to STZ MET, differing from the other groups ($p < 0.001$); As to the water intake, the greater the dose of the extract concentration, the lower the intake ($p < 0.001$). The weight gain of the animal SAL STZ groups and EEC 100 showed a significant decrease in the weight of the animal SAL CTL groups STZ MET, EEC 25 and EEC 50. There was no improvement in fasting glucose levels in the treated groups as well as in total cholesterol; however, the HDL-cholesterol of STZ MET groups and EEC 25 increased compared to the others ($p < 0.05$). Since LDL-cholesterol decreased in the STZ and EEC 25 MET groups ($p < 0.001$). The VLDL was increased in SAL STZ as compared with the other groups ($p < 0.001$), so did triglycerides. Histologically the liver EEC 25 and EEC 50 groups maintained the integrity of the liver tissue, and the histology of the pancreas, the EEC 25 group had pancreatic acini typical with islet of Langerhans typical. It follows these experimental conditions, the ethanol extract of cagaiteira leaves did not affect blood glucose levels, however, benefited from the lipid profile with potential for the treatment of dyslipidemia.

Keywords: *Eugenia dysenterica* DC., *diabetes mellitus*, dyslipidemia, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sinais e sintomas da hiperglicemia sem controle no <i>Diabetes mellitus</i>	19
Figura 2 – Ação da insulina e absorção da glicose em um indivíduo normal, com diabetes do tipo 1.....	20
Figura 3 – Ação da insulina e absorção da glicose em um indivíduo com diabetes do tipo 2.....	21
Figura 4 – Estrutura da molécula precursora da insulina, pró-insulina.....	24
Figura 5 – Função do transportador de glicose insulino-sensível (GLUT-4).....	25
Figura 6 – Função do transportador de glicose insulino-sensível (GLUT-2).....	26
Figura 7 – Processo da glicólise.....	27
Figura 8 – Processo de lipólise mediante estimulação por catecolaminas.....	27
Figura 9 – Visão geral do mecanismo de estímulo pela glicose da glicogênese no fígado.....	28
Figura 10 – Efeitos tóxicos da estreptozotocina e da aloxona em células beta pancreáticas em modelo de diabetes experimental.....	33
Figura 11 – Distribuição natural da cagateira em 110 localidades entre 376 levantamentos realizados no Bioma Cerrado.....	36
Figura 12 – Cagateira (<i>Eugenia dysenterica</i> DC.), B) Fruto da cagateira, C) Folha da cagateira.....	37
Figura 13 – Distribuição dos grupos experimentais.....	45
Figura 14 – Caracterização fitoquímica por análise cromatográfica (HPLC).....	49
Figura 15 – Análise histopatológica do fígado.....	56
Figura 16 – Análise histopatológica do pâncreas.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antioxidante com β -caroteno/ácido linoleico ($\mu\text{g/ml}$) e atividade antioxidante com o radical livre DPPH ($\mu\text{g/ml}$) do extrato etanólico das folhas de cagaiteira (<i>Eugenia dysenterica</i> DC).....	48
Tabela 2 – Flavonoides totais (mg/g) e fenóis totais (mg/g) do extrato etanólico das folhas de cagaiteira (<i>Eugenia dysenterica</i> DC.), coletadas em maio/2014, em Campo Grande - MS.....	48
Tabela 3 – Ingestão alimentar de animais controles e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas da cagaiteira.....	50
Tabela 4 – Ingestão hídrica de animais controles e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas da cagaiteira.....	51
Tabela 5 – Glicemia de jejum de animais controles e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Peso corporal (g) de animais controles (CTL SAL – não diabético tratado com salina/STZ SAL – diabético tratado com salina/STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. As letras indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CTL SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET; ^d comparado ao EEC 25, ^e comparado ao EEC 50. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.....52
- Gráfico 2 – A) Colesterol total (mg/dL); B) HDL colesterol (mg/dL); C) LDL colesterol (mg/dL); D) VLDL colesterol (mg/dL) e E) Triglicérides (mg/dL) de animais controle (CTL – não diabético tratado com salina/STZ DM – diabético tratado com salina/ STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. As letras indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CTL SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET; ^d comparado ao EEC 25; ^e comparado ao EEC 50. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
CTL EXT	Animais normais tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
EEC 25	Animais diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira na dose 25mg/kg
EEC 50	Animais diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira na dose 50mg/kg
EEC 100	Animais diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira na dose 100mg/kg
GAD65	Descarboxilase do ácido glutâmico
GLUT 2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GSK-3	Glicogênio sintase quinase 3
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IAA	Anticorpos anti-insulina
ICA	Anticorpos anti-ilhota pancreática
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
NAD ⁺	Nicotina adenina dinucleotídeo
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
STZ	Estreptozotocina
STZ SAL	Animais diabéticos tratados com salina
STZ MET	Animais diabéticos tratados com metformina
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 <i>Diabetes mellitus</i> (DM).....	20
2.2 Epidemiologia do <i>diabetes mellitus</i> (DM).....	21
2.3 Etiologia do <i>diabetes mellitus</i>.....	23
2.4 Insulina e sua função metabólica.....	24
2.5 Complicações do <i>diabetes mellitus</i>.....	28
2.6 Dislipidemia no <i>diabetes mellitus</i>.....	29
2.7 Tratamentos comumente utilizados para o <i>diabetes mellitus</i> e dislipidemias	31
2.8 Modelos experimentais de <i>diabetes mellitus</i>.....	32
2.9 Plantas medicinais e seu uso no tratamento do <i>diabetes mellitus</i>.....	24
2.10 Família Myrtaceae, gênero <i>Eugenia</i>, espécie <i>Eugenia dysenterica</i> DC.....	35
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAIS E METODOS.....	40
4.1 Coleta e seleção das folhas.....	40
4.2 Preparação do extrato etanólico.....	40
4.3 Avaliação da atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides totais e caracterização fotoquímica.....	40
4.3.1 Ensaio de atividade antioxidante β -caroteno/ácido linoleico.....	40
4.3.2 Ensaio da atividade antioxidante com o radical livre DPPH.....	41
4.3.3 Quantificação de flavonoides.....	42
4.3.4 Quantificação de fenóis totais.....	42
4.3.5 Caracterização fitoquímica.....	43
4.4 Parâmetros éticos.....	43
4.5 Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”.....	43
4.6 Indução do diabetes experimental.....	44
4.7 Divisão dos grupos.....	44

4.8 Tratamento com salina e com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (<i>Eugenia dysenterica</i> DC).....	45
4.9 Avaliação da ingestão hídrica e alimentar.....	46
4.10 Avaliação do peso corpóreo.....	46
4.11 Avaliação da glicemia de jejum.....	46
4.12 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	46
4.13 Avaliação do peso dos órgãos	47
4.14 Análise histológica do fígado e pâncreas.....	47
4.15 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Avaliação da atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides totais e caracterização fotoquímica.....	48
5.2 Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”.....	49
5.3 Indução de diabetes experimental.....	49
5.3.1 Avaliação da ingestão alimentar e hídrica.....	49
5.3.2 Avaliação do peso corporal.....	50
5.3.3 Avaliação da glicemia de jejum.....	51
5.3.4 Avaliação do perfil lipídico sérico.....	52
5.3.5 Análise histológica do fígado e pâncreas.....	55
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO 1.....	73
ANEXO 2.....	74
ANEXO 3.....	75

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é caracterizado como uma desordem metabólica, resultante de defeitos da ação ou secreção da insulina, ou ambos, defeitos estes que levam a alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios (CUPPARI, 2014). Tais alterações causam sérias consequências aos pacientes diabéticos, levando a graves complicações como perda de peso, elevando os níveis de lipídios no sangue, aumento da incidência de aterosclerose e doenças arteriais periféricas, danos à visão e aos rins, e em casos mais graves, óbito (OBOH; ADEMILUYI; FALOYE, 2011).

A incidência de pessoas diabéticas em todo mundo vem aumentando de modo alarmante ao longo dos anos, e pesquisas recentes têm mostrado que o número de diabéticos na população tende crescer cada vez mais nas próximas décadas (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010; VIGITEL, 2015).

Esse preocupante aumento na incidência do diabetes deve-se ao atual estilo de vida das pessoas, que inclui hábitos alimentares não saudáveis (ADISAKWATTANA; CHANATHONG, 2011), associado a maior prevalência de sobrepeso e/ou obesidade, com presença da gordura visceral e dislipidemia nestes pacientes, podendo contribuir para um maior risco de desenvolvimento de complicações macrovasculares (SIBLEY *et al.*, 2003; FRANZ *et al.*, 2002). Recentemente demonstrou-se que o risco cardiovascular no DM1 tem 4 e 8 mais chances em homens e mulheres, respectivamente (ADA, 2011).

Os tratamentos atuais para o DM incluem a insulino terapia, assim como o uso de hipoglicemiantes orais. No entanto, são relatados pelos pacientes, inúmeros efeitos colaterais e desconfortos causados pelos mesmos. Partindo dessas informações, a pesquisa por novos agentes que possam agir no controle do diabetes tornou-se alvo de estudos (ABDEL-HASSAN; ABDEL-BARRY; MOHAMMEDA, 2000). Nesse contexto, o estudo de plantas medicinais que possuam efeito hipoglicemiante e que atuem na melhora do quadro diabético tem despertado o interesse dos pesquisadores.

Myrtaceae é uma família botânica com muitos representantes na flora brasileira, e, desse modo, gera interesse nas pesquisas a respeito de suas espécies (COUTO *et al.*, 2009). O gênero *Eugenia dysenterica* DC., conhecida popularmente como cagaiteira ou cagaiteira, uma espécie frutífera nativa do Cerrado, cujas folhas tem indicação popular para o tratamento do diabetes, além de apresentarem substâncias, como compostos

fenólicos e atividade antioxidante, aos quais são atribuídos efeitos benéficos para a hipertensão arterial, dislipidemias e no processo inflamatório em geral (GENOVESE *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2011).

Com isso, esta pesquisa teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato etanólico das folhas de cagaiteira em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) na glicemia e parâmetros bioquímicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Diabetes mellitus* (DM)

O *diabetes mellitus* (DM) é um agrupamento de distúrbios metabólicos que desencadeia hiperglicemia crônica, resultante da deficiência da secreção de insulina, ou na incapacidade da insulina em exercer sua função adequadamente, como também a associação de ambos, com alteração no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios (OBOH; ADEMILUYI; FALOYE, 2011; CUPPARI, 2014).

Dentre os sinais e sintomas do DM está a glicosúria (concentração alta de glicose na urina), poliúria (aumento do volume urinário), desidratação e polidipsia (sede aumentada) (CARVALHEIRA *et al.*, 2002) (Figura 1).

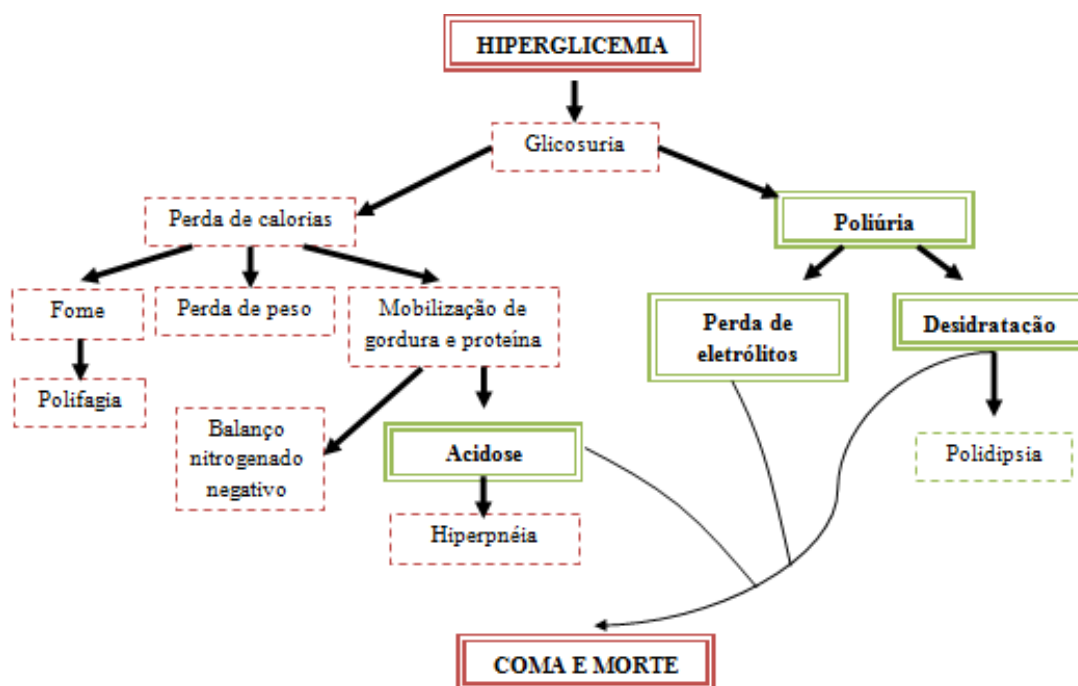


Figura 1 - Sinais e sintomas da hiperglicemia sem controle no *Diabetes mellitus*. A hiperglicemia desencadeia a glicosúria (eliminação de glicose pela urina), levando ao surgimento de dois fenômenos: a perda de calorías, devido ao aumento da metabolização de gorduras e proteínas gerando um balanço energético negativo, com aumento da fome associada a presença perda de peso, gerando acidose; e poliúria, que é o aumento do volume urinário levando a um processo de desidratação e perda de eletrólitos, sendo que ambos associado com a acidose leva o paciente ao coma ou até morte. Fonte: RUBIN *et al.*, 2011.

O diabetes, quando não tratado, leva ao surgimento de múltiplas complicações que incluem retinopatia com possíveis danos à visão, nefropatias podendo levar à insuficiência renal, neuropatias periféricas com risco de ulcerações no pé e amputação, como também apresentam risco elevado para desencadeamento de aterosclerose e doença arterial periférica, uma vez que o metabolismo lipídico está alterado (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

2.2 Classificação do *diabetes mellitus*

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e *American Diabetes Association* (ADA, 2011) a classificação do *diabetes mellitus* inclui quatro classes clínicas, sendo: *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de *diabetes mellitus* e *diabetes mellitus* gestacional.

O DM1 é um distúrbio vitalício da homeostase da glicose, ocorrendo devido à deficiência absoluta na produção de insulina, resultando da destruição auto-imune das células β nas ilhotas de Langerhans. A doença é caracterizada pela presença de pouca ou até mesmo a ausência células β funcionais, consequência da redução ou inexistência da secreção de insulina (Figura 2) (RUBIN *et al.*, 2011; DE MARIA *et al.*, 2011).

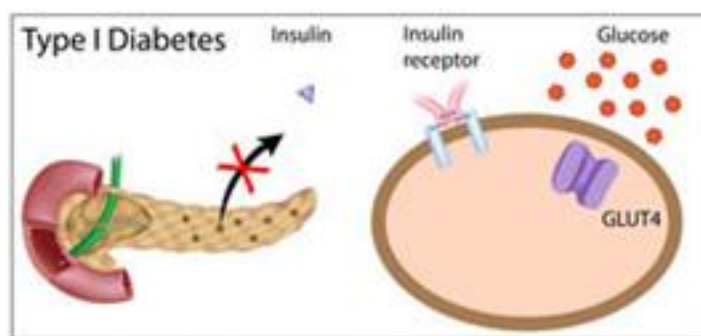


Figura 2 – Ação da insulina e absorção da glicose em um indivíduo com diabetes do tipo 1. No indivíduo normal, a insulina se liga ao seu receptor de membrana liberando a passagem da glicose sanguínea para dentro da célula por meio do GLUT-4. Em caso de DM1 não acontece ou a produção de insulina é insuficiente, devido a uma resposta auto-imune, levando ao excesso de glicose sanguínea.

Fonte: ATKINSON; EISENBARTH, 2001; STUMBOLL; GERICH, 2001.

A maior incidência do DM1 ocorre na infância e adolescência, correspondendo de 5 - 10% dos casos conhecidos. Tais pacientes portadores desse tipo de DM dependem do tratamento com insulina exógena para sustentação da vida, pois os mesmos desenvolvem anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpos contra a isoforma de 65 KDA da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A (ATKINSON; EISENBARTH, 2001). Ainda, existem aqueles diabéticos com características do DM1, porém sem evidências de autoimunidade, sendo dessa forma classificados como DM1 idiopático (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

O DM2 é caracterizado pela deficiência relativa da produção pancreática de insulina associada à redução da sensibilidade dos tecidos ao hormônio, conhecida também como resistência periférica à insulina, que ocorre nos momentos em que a concentração normal desse hormônio produz uma resposta biológica inadequada nos tecidos-alvos metabólicos (fígado, musculatura esquelética e tecido adiposo), ocorrendo redução na secreção de insulina estimulada pela glicose (Figura 3) (STUMBOLL; GERICH, 2001). Essa resistência à insulina que ocorre no DM2 pode ser por defeito na ação da insulina devido à redução do número de receptores ou menor afinidade, redução do número de proteínas transportadoras de glicose ou na translocação da mesma ao citoplasma (MCLELLAN *et al.*, 2007).

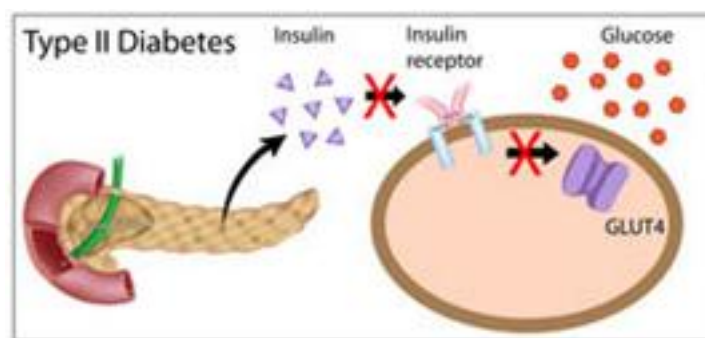


Figura 3 – Ação da insulina e absorção da glicose em um indivíduo com diabetes do tipo 2. No indivíduo normal, a insulina se liga ao seu receptor de membrana liberando a passagem da glicose sanguínea para dentro da célula por meio do GLUT-4. No DM2 acontece uma resistência à insulina devido à redução do número de receptores ou menor afinidade, redução do número de proteínas transportadoras de glicose ou na translocação da mesma ao citoplasma.

Fonte: ATKINSON; EISENBARTH, 2001; STUMBOLL; GERICH, 2001.

O DM2 afeta cerca de 90 – 95% de todos os casos de diabetes conhecidos, sendo mais comum nos indivíduos com idade superior aos 40 anos sendo que a maioria desses indivíduos são obesos, no entanto, observa-se atualmente, um aumento da incidência de DM2 em adultos jovens e adolescentes, devido ao agravamento da obesidade e a falta de exercício físico nesta faixa etária (GOLDSTEIN, L.E.; SPORN, J.; BROWN, 1999; WU *et al.*, 2011).

Correspondendo as formas de DM com menor incidência, chamada outros tipos específicos de DM, inclui-se nessa categoria defeitos genéticos das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outros (DE MARIA *et al.*, 2011).

No caso do DM gestacional ocorre uma tolerância diminuída à glicose, apresentando graus variados de intensidade, com diagnóstico pela primeira vez durante a gestação, podendo persistir ou não após o parto (WHO, 1999). Dentre os fatores associados ao surgimento do DM gestacional estão os descritos no DM2, adicionando outros fatores, como a idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez, deposição central de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão arterial sistêmica ou pré-eclâmpsia na gravidez e antecedentes obstétricos com morte fetal ou neonatal (GROSS *et al.*, 2002).

2.3 Epidemiologia do *diabetes mellitus* (DM)

Nos últimos 40 anos a prevalência de diabéticos em todo o mundo aumentou drasticamente conseqüente ao estilo de vida moderno, crescimento e envelhecimento da população, urbanização e aumento do consumo de dietas ricas em carboidratos (ADISAKWATTANA; CHANATHONG, 2011).

Em 1985 estimava-se que havia 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões em 2030 (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Em torno de dois terços desses indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (WILD *et al.*, 2004).

Há diferenças na prevalência de DM entre diversos países e grupos étnicos, sendo relatado na literatura taxas mais elevadas para Nauru, na Oceania, e para os índios Pima, no Arizona, Estados Unidos, onde praticamente metade da população adulta apresenta DM (EKOÉ *et al.*, 2008). A incidência de DM do tipo 1, mostra acentuada variação geográfica, sendo 38,4 na Finlândia, 7,6 no Brasil e 0,5 na Coreia, taxas para cada 100 mil indivíduos com menos de 15 anos de idade, por exemplo (ONKAMO *et al.*, 1999). Na maioria dos países desenvolvidos, quando se analisa apenas a causa básica do óbito, verifica-se que o DM está entre as principais, ocupando a quarta posição.

No Brasil, no final da década de 1980, estimou-se a prevalência de DM na população adulta em 7,6% (MALERBI; FRANCO, 1992), no entanto, dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 13,5% em São Carlos-SP (BOSI *et al.*, 2009) e 15% em Ribeirão Preto-SP (MORAES *et al.*, 2010).

Dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2015) mostram que a frequência de adultos que referiram diagnóstico médico prévio de diabetes variou entre 4,1% em Palmas e 9,5% em São Paulo. No sexo masculino, as maiores frequências foram observadas em Porto Alegre (9,0%), Curitiba (8,7%) e São Paulo (8,5%) e as menores em Palmas (3,0%), São Luís (3,1%) e Porto Velho (3,7%). Entre mulheres, o diagnóstico de diabetes foi mais frequente no Rio de Janeiro (10,7%), São Paulo (10,3%) e Vitória (9,5%) e menos frequente em Rio Branco (4,3%), Macapá (4,7%) e Boa Vista (4,8%).

Em Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul, 7,7% de sua população acima de 18 anos relata diagnóstico médico de diabetes, destes 6,9% são homens e 8,4% mulheres (VIGITEL, 2015).

2.4 Insulina e sua função metabólica

A insulina é o principal hormônio anabólico relacionado diretamente com o diabetes, responsável pela regulação do metabolismo intermediário, participação nos processos de crescimento e diferenciação celular, regulação do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos. Esse hormônio é secretado pelas células β das ilhotas

pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos que ocorre após as refeições (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

É um polipeptídeo formado por duas cadeias de aminoácidos chamadas de A e B. As mesmas são ligadas em duas pontes dissulfeto intercadeia, no qual a primeira conecta o resíduo A7 ao B7, enquanto a segunda conecta o resíduo A20 ao B19, e uma terceira ponte dissulfeto intracadeia A conecta o resíduo 6 ao 11 (Figura 4). A maioria das espécies de mamíferos apresenta cadeias A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) além da localização de três pontes dissulfeto invariável, como também apresenta atividade biológica ao redor de 25-30 UI mg⁻¹, em base seca (DE MARIA *et al.*, 2011).

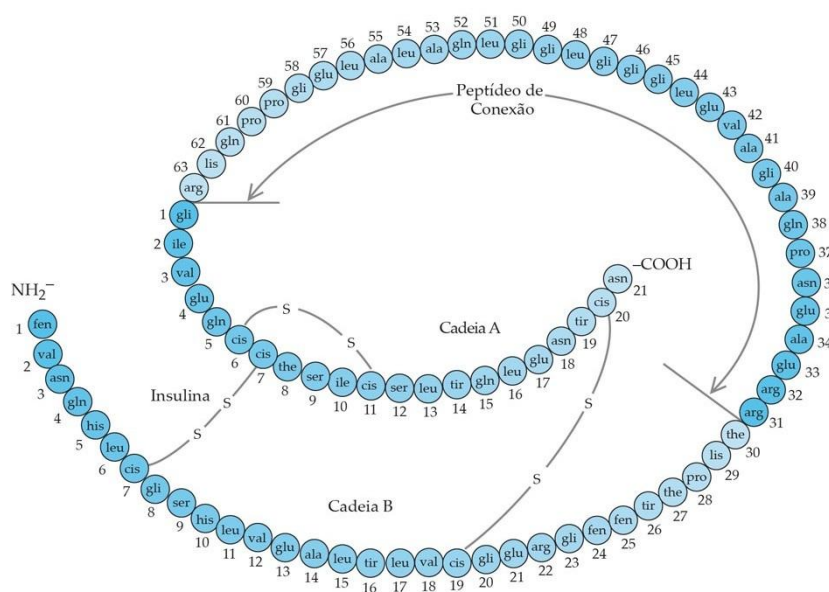


Figura 4 – Estrutura da molécula precursora da insulina, pró-insulina. O peptídeo que se conecta a cadeia A na Cadeia B é chamado de peptídeos de conexão (pontes de dissulfetos). A pró-insulina é convertida em insulina e peptídeos C são carregados juntos para as glândulas secretoras.

Fonte: GENUTH, 2008.

Após adquirir sua conformação final pela união das cadeias A e B, é então transportada para o aparelho de Golgi onde vai ser empacotada em grânulos de estoque. Durante a formação e maturação dos grânulos secretórios, a pró-insulina é clivada por enzimas proteolíticas do tipo tripsina, resultando na liberação do peptídeo C. Desse modo, as duas cadeias A e B estão ligadas entre si pelas pontes dissulfeto, ainda com outra ponte interna na cadeia A, formando a molécula de insulina (STEINER *et al.*, 1985).

Controlado pela glicemia, o hormônio peptídico conhecido como insulina é produzido e liberado pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta aos níveis plasmáticos de glicose elevados. Sendo assim, sua função primordial é normalizar níveis glicêmicos em indivíduos em situações hiperglicêmicas, promovendo ações que aumentem a captação da glicose sanguínea pelas células de diferentes tecidos (DEVLIN, 2011).

No tecido muscular e adiposo, por exemplo, a ligação da insulina à sua proteína receptora de membrana no meio extracelular desencadeia uma cascata de reações intracelulares que culminam com o deslocamento de vesículas ricas em GLUT-4 (transportador de glicose dependente de insulina) do interior da célula para a membrana plasmática. As mesmas se fundem na membrana, aumentando o número de GLUT-4 e a capacidade de captar glicose (Figura 5) (BRYANT *et al.*, 2002).

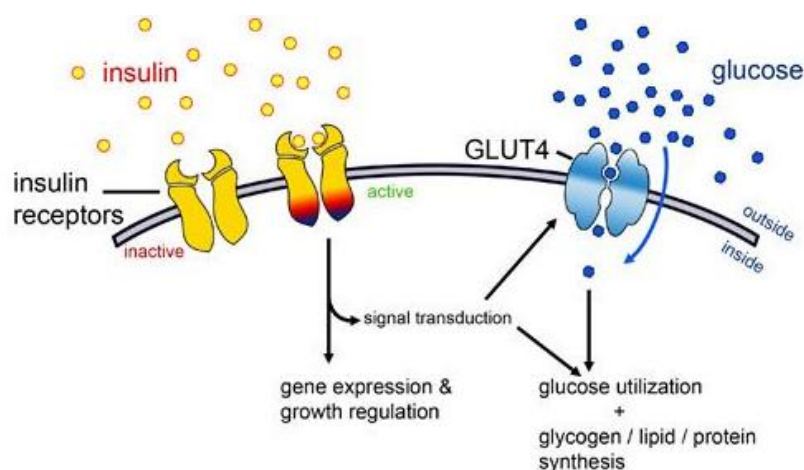


Figura 5 – Função do transportador de glicose insulino-sensível (GLUT-4). A insulina liga-se ao receptor na membrana ativando a cascata molecular para sinalização da abertura da proteína de transporte de glicose (GLUT-4). A abertura da proteína GLUT-4 possibilita a entrada da glicose na célula e, em seguida, ocorre o armazenamento da glicose na forma de glicogênio na célula do músculo esquelético. A geração de energia utilizada nas atividades celulares ocorre por meio do metabolismo da glicose a piruvato ou, então, ocorre a transformação e deposição da glicose em ácido graxo, nas células do tecido adiposo.

Fonte: BRYANT *et al.*, 2002.

Por outro lado, nas células hepáticas, o transportador de glicose é independente de insulina (GLUT-2), ou seja, a quantidade de GLUT-2 disponível nas membranas plasmáticas dessas células não é alterada por ação da insulina, sendo a mesma ainda capaz de incrementar a captação celular de glicose depois de ligar-se a proteína

receptora de membrana. Para tanto, a insulina irá ativar a enzima glicoquinase, responsável pela conversão em glicose-6-fosfato, garantindo uma concentração de glicose intracelular menor que a extracelular, favorecido pelo transportador GLUT-2 (Figura 6) (DE MARIA *et al.*, 2011).

Em consequência do aumento de glicose na célula faz-se necessário estabelecer um destino à mesma, e para isso a insulina passa a influenciar na utilização intracelular de várias formas.

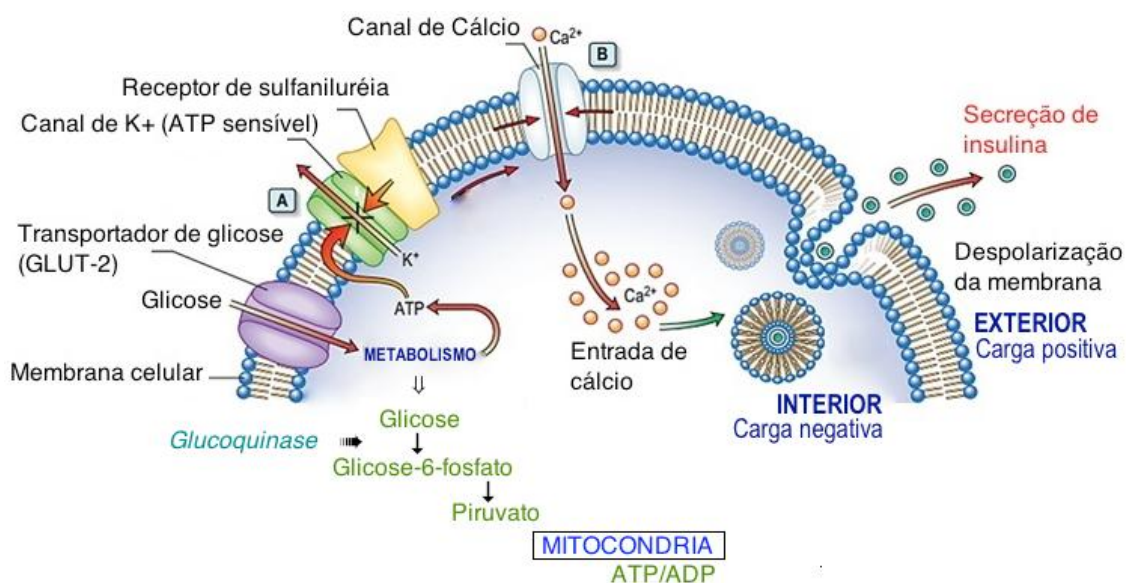


Figura 6 – Função do transportador de glicose insulino-sensível (GLUT-2). A glicose entra na célula beta das ilhotas de Langerhans através do GLUT-2 proteína transportadora, que está intimamente associado com a glucoquinase enzima glicolítica. Metabolismo da glicose dentro da célula beta gera ATP. ATP fecha os canais de potássio na membrana celular (A). Se uma sulfonilureia se liga ao seu receptor, este também fecha os canais de potássio. Encerramento de canais de potássio predispõe à despolarização da membrana celular, permitindo que os íons de cálcio entre na célula através de canais de cálcio na membrana celular (B). O aumento do cálcio intracelular desencadeia a ativação de cálcio proteína quinase dependente de fosfolípidos que, por meio de passos de fosforilação intermediários, leva à fusão dos grânulos que contêm a insulina com a membrana celular e exocitose do conteúdo de insulina. A secreção de insulina é pulsátil.

Fonte: KASANICK E PILCH, 1990; BELL *et al.*, 1993.

Cerca de 50% da glicose ingerida é convertida em energia pela ativação primária da via metabólica conhecida como glicólise; de 30-40% da glicose ingerida é convertida em gordura, do tipo triglicerídeo, e estocada no tecido adiposo, processo conhecido como lipogênese; e cerca de 10% é convertida em glicogênio, por meio da gliconeogênese, sendo estocada no fígado e na musculatura esquelética. Sendo assim,

percebe-se que a insulina ativa além da glicólise, via metabólica responsável pela degradação de glicose para produção de energia (Figura 7); a lipogênese, síntese de lipídios (Figura 8); e a glicogênese, síntese de glicogênio (Figura 9) (DEVLIN, 2011).

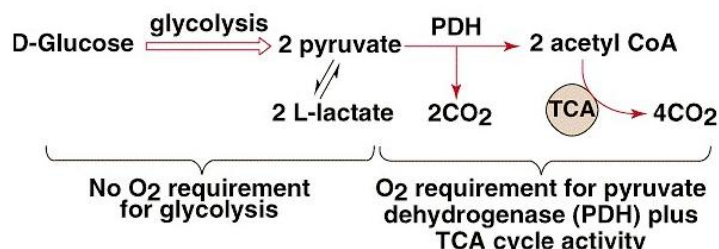


Figura 7 – Processo da glicólise. Via preparatória para o metabolismo aeróbico da glicose. Processo capaz de produzir 2 moles de ATP a partir de 1 mol de glicose, em ausência de oxigênio. Na presença de oxigênio, surge como produto final o piruvato, que é então, completamente oxidado a CO₂ e H₂O pelo complexo piruvato desidrogenase e enzimas do ciclo TCA alojadas dentro das mitocôndrias.

Fonte: DEVLIN, 2011.

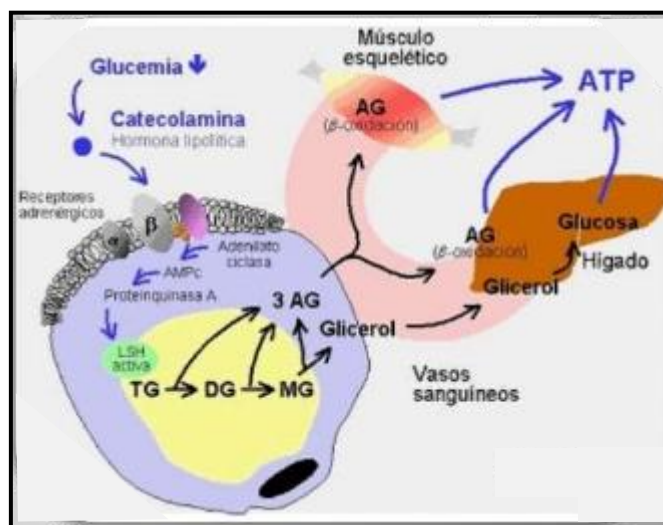


Figura 8 – Processo de lipólise mediante estimulação por catecolaminas. O conteúdo energético armazenado sob forma de triacilgliceróis é hidrolisado em diacilglicerol (DAG) e monoacilglicerol (MAG), para finalmente ocorrer liberação de três moléculas de ácidos graxos e uma molécula de glicerol por molécula de TAG para ser utilizado como fonte de energia. O processo de lipólise é dependente da ativação da enzima lipase hormônio sensível (HSL) por meio de uma fosforilação realizada pela cinase proteica A (PKA) e ocorre, mediante estimulação por catecolaminas quando há grande demanda energética, ou no estado de jejum prolongado.

Fonte: YEAMAN, 2004; LAFONTAN *et al.*, 2009.

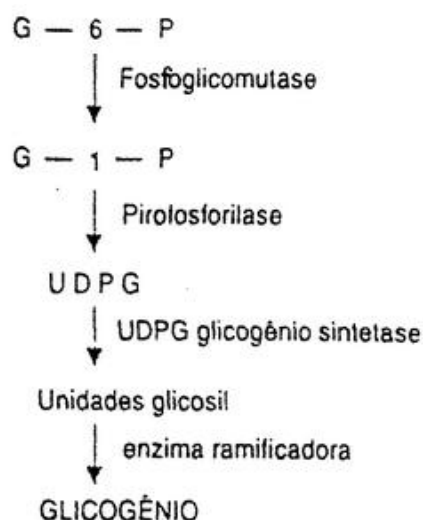


Figura 9 – Visão geral do mecanismo de estímulo pela glicose da glicogênese no fígado. Para dar início à síntese do glicogênio, a fosfoglicomutase transforma glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato. O produto da ação da fosfoglicomutase, a glicose-1-P é convertida na presença de UTP (nucleotídeo carreador da glicose para a síntese de glicogênio) pela ação da UDP-glicose-pirofosforilase, a UDP-glicose (um nucleotídeo de açúcar) e glicogênio.

Fonte: DEVLIN, 2011.

2.5 Complicações do *Diabetes mellitus*

As complicações originadas pelo diabetes tanto agudas como crônicas estão associadas a fatores condicionantes que advêm do próprio estilo de vida do portador, ou seja, como ele detém o controle dos níveis glicêmicos através do seu tratamento (MORAIS *et al.*, 2009).

Esta preocupação com o controle dos níveis glicêmicos é de suma importância, visto que a hiperglicemia persistente culmina em processos patológicos intensos como as neuropatias, retinopatias, nefropatias e cardiopatias, podendo comprometer ainda mais a saúde desses pacientes (LAURINDO *et al.*, 2005).

Além dessas complicações supracitadas, ao longo de suas vidas tais pacientes podem desenvolver úlceras de membros inferiores. Segundo Parisi (2001), cerca de 20% dos pacientes diabéticos desenvolvem úlceras de membros inferiores e 25% de todas as internações que ocorrem com os mesmos são decorrentes de problemas nos membros inferiores, merecendo destaque como um agravo que pode levar a danos e incapacidades. Tal complicação envolve uma série de fatores que desencadeia um

processo denominado pé diabético, constituindo um grave problema de saúde pública, devido a um quadro devastador e mutilante em decorrência das complicações das ulcerações (infecção e amputação) (ZEVALA; BRAVER, 2000).

Outro fator relacionado com o controle dos níveis de glicemia são os hábitos alimentares, no qual, quando acontece mudança comportamental alimentar permite a diminuição dos fatores de risco cardiovasculares, como a obesidade, hipertensão arterial e dislipidemias, patologias que acometem cerca de 68% dos portadores de DM. O fornecimento de calorias suficientes para manutenção de um peso saudável, previne as complicações agudas e crônicas e promove a saúde geral do paciente. Para tanto, a dieta deve ser individualizada de acordo com as particularidades de cada indivíduo, incluindo idade, sexo, situação funcional, atividade física, doenças associadas e situação sócio econômico (ATAÍDE; DAMACENO, 2006).

Além disso, o sedentarismo impede o bom funcionamento da circulação, isso faz com que haja aumento da glicemia associada à diminuição da captação de glicose, reduzindo, dessa forma, a ação da insulina no diabetes tipo 2. A atividade física além de melhorar à captação da glicose, colabora no controle de peso, da hipertensão arterial, redução de colesterol e triglicérides (ALVES, 2006).

2.6 Dislipidemia no *Diabetes mellitus*

As dislipidemias são alterações do metabolismo das gorduras, repercutindo sobre os níveis das lipoproteínas. Estas são partículas que transportam lipídios apolares (insolúveis em água) em seu núcleo. Os mesmos são constituídos por quantidades variáveis de colesterol e seus ésteres, triglicérides, fosfolípidos e proteínas, denominadas apolipoproteínas, as quais são solúveis no meio aquoso plasmático devido à natureza hidrófila da parte proteica (SANTOS *et al.*, 2015).

Com base na densidade, as lipoproteínas plasmáticas são separadas em quilomícrons (ricas em triglicérides de origem intestinal), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL – ricas em triglicérides de origem hepática), lipoproteínas de densidade baixa (LDL – ricas em colesterol) e lipoproteínas de densidade alta (HDL – ricas em colesterol) (MOTTA, 2009).

Etiologicamente a dislipidemia é classificada como dislipidemia primária que é de origem genética causada pela desordem da síntese e degradação de lipídios, e dislipidemia secundária que é causada por outras doenças ou uso de medicamento, como, por exemplo, a presença de DM e obesidade (SANTOS, 2001).

A produção desregulada de colesterol no organismo dos seres humanos, pode acarretar sérios problemas, como obstrução das paredes do vaso sanguíneo, denominado aterosclerose, processo ligado ao aumento do colesterol no sangue (LEHNINGER, 2006). Gonçalves e colaboradores (2006) citam que, nas últimas décadas, a relação lipídios e lipoproteínas e a doença arterial coronariana tem sido intensamente estudada, e a procura continuada do entendimento de como as dislipidemias são capazes de levar ou facilitar o desencadeamento da aterosclerose vem fascinando muitos investigadores, suscitando em importantes descobertas.

Nos últimos anos têm-se observado um aumento da prevalência de dislipidemia na população geral (LEMOS, 2003). As mudanças no estilo de vida, como o aumento do sedentarismo e hábitos alimentares ricos em carboidratos e gorduras, com conseqüente sobrepeso e obesidade, podem ser fatores contribuintes para o aumento dessa prevalência (ANDRADE; CLEMENTE; GOMES, 2003). Níveis elevados de triglicérides, por sua vez, teriam papel indireto neste processo por determinar partículas de LDL-colesterol pequenas e densas que seriam mais aterogênicas (JENKINS, 2003).

O Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1) é a endocrinopatia mais comum na infância e adolescência (ADA, 2011). A intensificação do tratamento insulínico no DM1 está resultando em uma melhora do controle clínico e metabólico da doença, com conseqüente aumento da sobrevida dos pacientes (NISHIMURA *et al.*, 2001). A presença do DM1 associado ao aumento da prevalência de sobrepeso e/ou obesidade com aumento da gordura visceral e dislipidemia contribui para um maior risco de desenvolvimento de complicações macrovasculares (SIBLEY *et al.*, 2003; FRANZ *et al.*, 2002). Diferentemente do paciente com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), onde os fatores de risco cardiovasculares estão devidamente definidos, na população com DM1 esta relação ainda não está bem estabelecida (JENKINS *et al.*, 2003).

Recentemente demonstrou-se que o risco cardiovascular no DM1 está aumentado 4 e 8 vezes em homens e mulheres, respectivamente, mesmo naqueles sem doença renal evidente (SOEDAMAH-MUTHU *et al.*, 2004; LAING *et al.*, 2003). Este risco, em alguns trabalhos, está associado à presença de doença arterial obliterante e

apresenta-se aumentado significativamente na população diabética do sexo feminino (SOEDAMAH-MUTHU *et al.*, 2004).

2.7 Tratamentos comumente utilizados para o *diabetes mellitus* e dislipidemia

Os tratamentos para DM comumente utilizados incluem a insulinoterapia (uso de insulina exógena) e a administração de drogas alopáticas como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores de alfa-glicosidase (acarbose e miglitol), podendo ou não ser administrados em conjunto (HSU *et al.*, 2009).

Tais agentes hipoglicêmicos orais exercem seus efeitos na redução da glicemia por meio de vários mecanismos; no caso da metformina, a mesma pode agir na redução da produção hepática de glicose; já as sulfoniluréias, aumentando a secreção de insulina pelas células beta do pâncreas; a metformina e tiazolidinediona agem também melhorando a sensibilidade à insulina (CHENG; FUNTUS, 2005).

A metformina é um medicamento produzido por derivados de guanidina, um composto com ação hipoglicemiante proveniente da *Galega officinalis*, uma erva medicinal francesa utilizada desde a época medieval na Europa para o tratamento do diabetes (BAILEY; DAY, 1989).

Além de sensibilizador periférico para a insulina, a metformina é um medicamento que promove a inibição da neoglicogênese e glicogenólise no fígado, Já em outros tecidos periféricos, como por exemplo, musculatura esquelética, é responsável pelo aumento da captação de glicose gerando uma rápida redução da glicemia plasmática; no adipócito inibe a lipólise e a disponibilidade de ácidos graxos livres, sendo assim, é o medicamento em nível celular que tem melhor demonstrado elevação da atividade da tirosina quinase, do receptor de insulina estimulando a translocação do transportador GLUT4 e a atividade de enzima glicogênio sintase (SANTOS *et al.*, 1995). Diferentemente do que acontece a secretagogos, a metformina não aumenta os níveis plasmáticos de insulina (BAILEY; TURNER, 1996).

Existem também as sulfoniluréias, drogas com ação hipoglicemiante que atuam no pâncreas elevando a secreção de insulina por meio da ligação com os receptores na superfície das células β pancreáticas, sendo intimamente ligadas a subunidades dos canais de potássio sensíveis ao ATP que induz o fechamento dos mesmos inibindo a

saída dos íons de potássio, desencadeando a despolarização da membrana e secreção de insulina; dentre elas estão as clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida e glimeperida. Entretanto, por esses fármacos, em alguns casos, afetarem de forma ineficiente a sensibilidade à insulina, podem levar a efeitos indesejáveis como hipoglicemia e ganho de peso, e, a longo prazo, danos renais e hepáticos (CHENG; FUNTUS, 2005).

Já as tiazolodinedionas agem na sensibilização da ação da insulina, aumentando a expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídeos, preservando as funções das células β pancreáticas (GOMES, 2006) levando a edema, hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca congestiva (CHENG; FUNTUS, 2005; GOMES, 2006).

Por outro lado, os inibidores da α -glicosidade (acarbose e miglitol) tem ação antagonista das enzimas α -amilase e reduz a absorção de glicose no intestino (JENMEY *et al.*, 1993; SEGAL, 1997), não interferindo na secreção de insulina, diminuição da glicemia de jejum e na hiperglicemia pós-prandial (ARAUJO; BRITTO; PORTO DA CRUZ, 2000).

2.8 Modelos experimentais de *diabetes mellitus*

Em consequência a necessidade de melhor compreender a etiologia a o descobrimento de novas fórmulas e agentes terapêuticos para o tratamento do DM foram desenvolvidos modelos experimentais para simular a patologia do ser humano, os quais são realizados por meio do uso de substâncias que destroem as células β -pancreáticas responsáveis pela produção de insulina. Dentre essas substâncias, as mais citadas na literatura são a aloxana e a estreptozotocina (STZ) (SZKUDELSKI, 2001).

Ambas substâncias, estreptozotocina e aloxana, são citotóxicas, análogas da glicose, sendo o modo de captação das mesmas pelas células β do pâncreas iguais, por meio do transportador de glicose do tipo GLUT 2 (LENZEN, 2008).

A STZ é um glicosídeo nitrosuréia natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*, e tem sido muito utilizada para indução do DM1, dependendo da concentração, dose e via de administração, causando a deficiência de insulina com quadro de hiperglicemia (SZKUDELSKI, 2001; NEGRI, 2005).

A indução de DM utilizando a STZ em doses subdiabetogênicas (40mg/kg) produz insulite pancreática, levando a uma inflamação e morte progressiva das células β , desencadeando o DM. Estudos apontam que pequenas doses em dias consecutivos culminam no surgimento de lesões inflamatórias nas ilhotas (LENZEN, 2008). Já quando a indução ocorre com a STZ nas doses 160 à 250 mg/kg causa efeito citotóxicos nas células β , levando a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) (Figura 10), com fragmentação e alquilação dos mesmos, exaurindo a nicotina adenina dinucleotídeo (NAD⁺), inibindo a biossíntese e a secreção de insulina, iniciando à partir daí a destruição das células β por depleção de energia. Na indução com STZ é possível observar, após duas horas da injeção, hiperglicemia; com cinco horas, devido a destruição das células β e concomitante liberação do conteúdo de insulina, ocorre hipoglicemia; e após dias, a hiperglicemia se desenvolve e ocorre redução irreversível dos níveis de insulina sanguínea (GUPTA *et al.*, 2014).

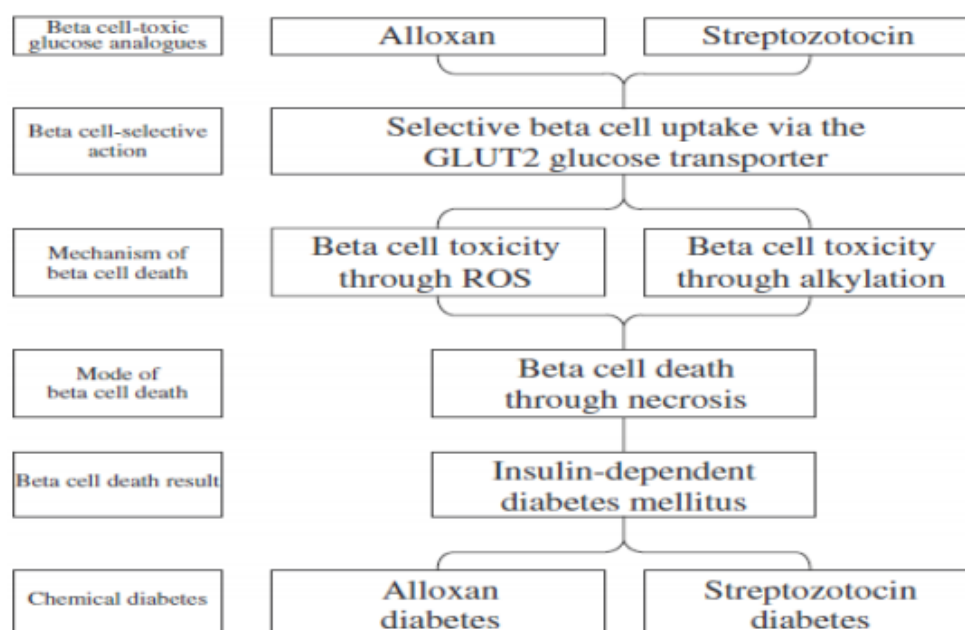


Figura 10 - Efeitos tóxicos da estreptozotocina e da aloxona em células beta pancreáticas em modelo de diabetes experimental. Tanto a aloxona quanto a estreptozotocina causam o DM por meio da deficiência da produção de insulina e morte das células β , no entanto a aloxona tem ação tóxica mediada por EROs e a estreptozotocina via alquilação do DNA das células β .

Fonte: LENZEN, 2008.

No caso da aloxona, derivada de pirimidina, a mesma apresenta captação rápida pelas células β -pancreáticas, com formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a consequentes danos ao DNA das ilhotas pancreáticas. No entanto, estudos

apontam que sua seletividade de ação não é satisfatória quando comparada com a STZ (SZKUDELSKI, 2001), pois há relatos de problemas devido à sua instabilidade química, metabolismo rápido e alguns outros fatores, como dieta e idade, que tornam quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses da mesma e sua concentração efetiva no pâncreas (Figura 9) (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

2.9 Plantas medicinais e seu uso no tratamento do *diabetes mellitus*

Para melhor convívio com o DM, se faz necessário o controle rigoroso da glicemia, uma vez que não existe cura. As intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos, no entanto são de custos elevados e manifestam efeitos colaterais, motivo pelo qual desperta interesse dos pesquisadores em conhecer os efeitos de substâncias naturais na redução dos níveis de glicose sanguínea, visto a preferência dos diabéticos para o uso de suplementação e terapias alternativas, como uso das ervas medicinais (ABDEL-HASSAN; ABDEL-BARRY; MOHAMMEDA, 2000).

Antes do advento da insulina exógena e hipoglicemiante oral, o uso de plantas medicinais era a principal forma de controle do DM, por serem importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (GRAY; FLATT, 1999). Várias são as espécies vegetais que tem sido estudadas como benéficas no controle do DM, como: o alho (*Allium sativum* L.), babosa (*Aloe* sp), boa noite (*Catharanthus roseus* L. G. Don), carqueja (*Baccharis genisteloides* var . trimera), cebola (*Allium cepa* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), graviola (*Annona muricata* L), insulina vegetal (*Cissus sicyoides* L.), pata de vaca (*Bauhinia forficata* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.), quixaba (*Bumelia sartorum* Mart.), rom (*Punica granatum* L.) e sucupira (*Bowdichia virgiloides* Kunth) (CARVALHO *et al.*, 2005).

Os princípios ativos de tais plantas agem aumentando a liberação de insulina, modificando o metabolismo da glicose, inibindo fatores hiperglicemiantes, inibindo ou estimulando a síntese de enzimas ou ainda atenuando as complicações do DM (DORNAS *et al.*, 2009). Ganham destaque os polissacarídeos, proteínas, esteroides, terpenóides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (ABDEL-HASSAN; ABDEL-BARRY; MOHAMMEDA, 2000).

São vários os mecanismos evidenciados em plantas para a redução dos níveis de glicose, como por exemplo, aquelas que exibem propriedades similares aos fármacos pertencentes à conhecida classe das sulfoniluréias como glibenclamida, em que o efeito hipoglicêmico ocorre pelo estímulo do aumento da produção de insulina pelas células- β pancreáticas como observado pelo tratamento com *Enicostemma littorale* Blume (MAROO *et al.*, 2002) e *Gmelina asiatica* Linn. (KASIVISWANATH *et al.*, 2002) que exercem atividade hipoglicemiante devido inibição dos canais ATPase de K^+ nas células- β pancreáticas.

Já outras plantas melhoram a ação periférica da insulina sugerindo aumento significativo do estímulo da insulina ao disponibilizar glicose para consumo tecidual, diminuindo a concentração de glicose sanguínea que alcançam faixas consideradas normais, e, assim, reduzindo requerimento de insulina. Esses dados são vistos em estudos atuais como no tratamento com extrato de *Panax ginseng* sp. (XIE *et al.*, 2005), *Eugenia jambolana* Lam. (SHARMA *et al.*, 2003), *Cleomeo felina* L. (NAGARAJAN *et al.*, 2005), *Smallantus sonchifolius* Poepp (AYBAR *et al.*, 2001), *Scoparia dulcis* L. (LATHA; PARI, 2004), dentre outros.

Como também, ação na inibição sobre α -glicosidase, maltase e sucrase, efeito promovido pelo extrato aquoso da flor de *Eugenia operculata* Roxb., além de sugerir pelos resultados *in vivo* que esta melhora o diabetes (MAI; CHUYEN, 2007), como resultado da presença da epicatequina, flavonoide com atividade antihiper-glicêmica (KURIHARA *et al.*, 2003).

2.10 Família Myrtaceae, gênero *Eugenia*, espécie *Eugenia dysenterica* DC

A família Myrtaceae vem ganhando destaque por ser uma das famílias mais importantes da flora brasileira com 129 gêneros e cerca de 4620 espécies (WILSON *et al.*, 2001; BRANDÃO, 1991). Considerada a família com maior diversidade de espécies nos neotrópicos, correspondendo de 10 à 15% da vegetação ao longo da Mata Atlântica e do Cerrado brasileiro (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000), sendo, ainda, a terceira família mais representativa do cerrado brasileiro e dominante em número de espécies na área basal total de algumas florestas úmidas do leste do Brasil (MORI *et al.*, 1983).

Apenas no Brasil existem cerca de 25 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies de Myrtaceae (LANDRUM; KAWASAKI, 1997), sendo a de maior destaque o gênero *Eugenia* por apresentar cerca de 500 espécies no uso medicinal (BRANDÃO, 1991).

O gênero *Eugenia* é amplamente conhecido por ser alvo de estudos quanto ao potencial antihiperlipidêmico, como, por exemplo, a *Eugenia uniflora*, que além de ser utilizada como antitérmico, antiinflamatório e para reduzir níveis de glicose no sangue, também tem sido investigado sua eficácia quanto ao tratamento de doenças digestivas (COLE *et al.*, 2007).

Outras espécies, como *Eugenia jambolana*, demonstrou em estudos potencial efeito antihiperlipidêmico e anti-diabético devido a existência de frações ricas em flavonoides em sua composição, com capacidade de modular as enzimas que metabolizam carboidratos e lipídios, bem como atenuar a diferenciação de adipócitos *in vitro* (SHARMA *et al.*, 2011; JADEJA *et al.*, 2012). No Brasil, os frutos e as folhas da *Eugenia malaccensis*, popularmente conhecida como jambo vermelho, é utilizada como adstringente e estimulante do apetite, diurético e no tratamento de anemias; já em outras partes do mundo é utilizado como antiinflamatório e anti-diabético (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A *Eugenia dysenterica* DC., conhecida popularmente com cagaita, é mais uma representante da família Myrtaceae, uma espécie frutífera nativa do Cerrado (Figura 11) (LIMA *et al.*, 2011).

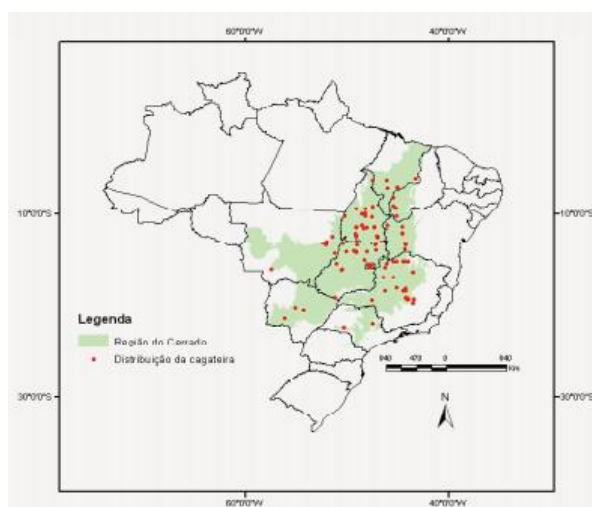


Figura 11 - Distribuição natural da cagaita em 110 localidades entre 376 levantamentos realizados no Bioma Cerrado.

Fonte: RATTER *et al.* 2003.

A *E. dysenterica* é uma árvore de altura mediana (4 – 10 metros), ramos e troncos tortuosos, com folhas quando novas membranáceas e adultas coriáceas, com glabras nas duas faces. Ao florescer formam panículas fasciculadas e são brancas, delicadas com quatro pétalas, com cálice de quatro lacínios ovados e ciliados, e o frutos são bagas globosas, suculentas, de cor amarelo clara e de sabor agradável a levemente ácido. Suas sementes são elipsóides e achatadas (RIZZINI, 1971) (FIGURA 12).



Figura 12 – A) Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), B) Fruto da cagaiteira, C) Folha da cagaiteira

Fonte: Arquivo pessoal.

No uso popular é relatado que o fruto apresenta propriedade laxativa, se manifestando, principalmente, no fruto maduro e em início de fermentação (LIMA *et al.*, 2011). Além disso, suas folhas têm propriedades antidiarreicas, existindo relatos do seu uso para o tratamento da diabetes (SOUZA *et al.*, 2012). Estudos apontaram atividade antifúngica, devido ao óleo essencial das folhas, rico em sesquiterpenos, como o beta-cariofileno e o alfa-humuleno, e em monoterpenos, como o limoneno e o alfatujeno (COSTA *et al.*, 2000).

Além disso, Genovese *et al.* (2008) confirmam a presença de vitamina C, um antioxidante; e Couto *et al.* (2009) identificaram compostos fenólicos (flavonoides e taninos), substâncias as quais são atribuídos efeitos benéficos para o tratamento de várias patologias, dentre elas a hipertensão arterial e no processo inflamatório em geral (HASLAM, 1996; DE BRUYNE *et al.*, 1999; DUFRESNE, FARNWORTH, 2001).

No entanto, não há estudos que concretizem tais propriedades, assim como, não há evidência, até o presente momento, do possível efeito benéfico do extrato da folha da cagaiteira frente ao *diabetes mellitus* e aos seus transtornos metabólicos.

Com isso, esta pesquisa tem por objetivo avaliar quais os efeitos terapêuticos da folha de uma planta do cerrado, a cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC), em modelo experimental de *diabetes mellitus*. Dessa forma contribuirá para a descoberta de um novo recurso para prevenção e/ou tratamento da mesma, contribuindo assim no aumento do seu consumo e de sua produtividade, favorecendo a economia regional e a saúde da população.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos do extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) em camundongos diabéticos induzido com estreptozotocina.

3.2 Objetivos específicos

Elaborar o extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.).

Determinar teores de fenólicos totais e carotenoides totais, e capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.).

Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), administrado em na dose única de 2000mg/kg em camundongos normais.

Avaliar ingestão hídrica, ingestão alimentar e peso corpóreo de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), nas doses de 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal.

Avaliar glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e frações de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), nas doses de 25, 50, 100, mg/kg de peso do animal.

Avaliar condições estruturais do fígado e do pâncreas por meio de parâmetros histológicos de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), nas doses de 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e seleção das folhas

As folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) foram coletadas no turno matutino, durante o período de pré-antese de um espécime adulto localizado em duas localidades residenciais do município de Campo Grande – MS, em maio de 2014. A árvore foi identificada e marcada com placa, as coordenadas geográficas definidas através de GPS manual (latitude 20°27'19,5''S e longitude 54 °34'43,2''W) (voucher number: CGMS 52.819).

Após a coleta, foram conduzidas ao Departamento de Química da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (UEMS), Dourados-MS, onde as amostras foram dessecadas à temperatura ambiente, trituradas em moinho de facas e acondicionadas ao abrigo de luz e umidade.

4.2 Preparação do extrato etanólico

Para a obtenção do extrato etanólico, a amostra foi acondicionada para extração com solução aquosa de etanol (5:95, v.v-1, água:etanol) na proporção de 1:3 (m.m⁻¹) folha:solução de etanol. O material foi filtrado em gazes e o resíduo foi reextraído nas mesmas condições. O material obtido, extrato etanólico, foi colocado em rotaevaporador a 40 °C e armazenados em frascos encapados com papel alumínio e mantidos em temperatura ambiente até a utilização (ROESLER *et al.*, 2007).

4.3 Avaliação da atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides totais e caracterização fotoquímica

4.3.1 Ensaio de atividade antioxidante β -caroteno/ácido linoleico

O ensaio de atividade antioxidante empregando o sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizado como descrito por Tepe e colaboradores (2005), modificado. Uma solução estoque de β -caroteno e ácido linoleico foi preparada a partir de 0,5 mg de β -caroteno dissolvido em 1 mL de clorofórmio e adicionado a 25 μ L de ácido linoleico e 200 mg de Tween 20. O clorofórmio foi removido com o uso de nitrogênio líquido. A mistura resultante teve seu volume completado para 100 mL de água milli-Q aerada. O teste foi realizado através da adição de 2,5 mL da mistura e 0,3 mL de amostra em solução metanólica nas concentrações de 10-200 μ g mL⁻¹ e imediatamente a leitura foi realizada no tempo zero a 470 nm e 2h depois dos tubos permanecerem incubados a 50 °C em banho-maria. O controle foi preparado substituindo a amostra pelo mesmo volume de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A inibição da peroxidação foi calculada a partir da equação:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = \left[\frac{\text{Conteúdo de } \beta\text{-caroteno depois de 2 h}}{\text{Conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}} \right] \times 100$$

4.3.2 Ensaio da atividade antioxidante com o radical livre DPPH

O teste de atividade antioxidante com o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) foi realizado com a amostra nas concentrações de 10-200 μ g mL⁻¹, em metanol. Preparou-se uma solução de DPPH (40 μ g/mL) em metanol. Adicionou-se 1,00mL da solução de DPPH para cada 0,50 mL de amostra. Deixou-se reagir por 30 minutos antes de se fazer a leitura em espectrofotômetro a 517nm. Fez-se o mesmo procedimento para o branco e através das absorbâncias foi calculado o percentual de inibição (PI) (KUMARAN e KARUNAKARAN, 2006).

$$\%PI = \frac{[A_0 - A]}{A_0} \times 100$$

Equação utilizada para verificação do percentual de inibição, onde PI é o percentual de inibição, A corresponde à absorbância da amostra contendo apenas DPPH

decorridos 30 minutos de reação e A_0 corresponde à absorvância da amostra contendo DPPH e o extrato decorridos 30 minutos de reação.

4.3.4 Quantificação de flavonoides

A cada 500,00 μL da amostra ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) adicionaram-se 1,50 mL de álcool etílico 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio 10% ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0,10 mL de acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (1 mol L^{-1}) e 2,80 mL de água destilada. Deixou-se reagir à temperatura ambiente por 40 minutos. Fez-se a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituídos 500,00 μL de amostra por 500,00 μL de metanol (LIN e TANG, 2007). Para calcular a concentração de flavonoides foi preparada uma curva analítica (2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 125,0 μg) empregando a quercetina como padrão. O resultado foi expresso em mg de quercetina por g de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3.5 Quantificação de fenóis totais

A cada 100 μL de amostra ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) adicionou-se 1,5 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2%, 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau (1:10 v/v) e 1 mL de água destilada. Reagiu-se por 30 minutos. Fez-se a leitura no espectrofotômetro num comprimento de onda de 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, sendo substituído 100 μL de amostra por 100 μL de metanol para as amostras (DJERIDANE *et al.*, 2006). Para calcular a concentração de fenóis foi preparada uma curva analítica (1,0; 5,0; 10,0; 15,0; 30,0; 40,0 μg) empregando o ácido gálico como padrão. O resultado foi expresso mg de ácido gálico por g de extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.3.5 Caracterização fitoquímica

A caracterização fitoquímica do extrato etanólico das folhas de cagaiteira foi realizada utilizando um HPLC com sistema analítico (Varian 210). O mesmo apresenta sistema de distribuição de solvente ternário e um amostrador automático. O detector de arranjo de diodos (DAP) foi monitorizado a $\lambda = 200-800$ nm. A coluna de HPLC era C-18 (25 cm x 4,6 mm; tamanho de partícula, de 5 μ m; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, EUA), com uma pequena pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) contendo a mesma embalagem para proteger a coluna analítica. A taxa de fluxo e volume injetado foi 1,0 mL.min⁻¹ e 20 μ l, respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22° C.

A fase móvel empregada foi de constituída 6% de ácido acético em água com 2 mM de solução de acetato de sódio (eluente A) e metanol l (eluente B). As análises foram realizadas empregando a eluição em sistema gradiente: 0 min 5% B, 30 min, 15% B, 35 min, 30% B, 40 min, 50% B, 45 min 100%. O extrato foi injetado na concentração de 100 μ g/ml. O padrão na concentração de 1° μ g/ml. Para a quantificação dos padrões foi empregado o método do padrão externo obtendo uma curva com $r=0,9994$ para quercetina e $r=0,9992$ para ácido gálico.

4.4 Parâmetros éticos

A pesquisa corresponde a um estudo experimental desenvolvido na Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (UTASP - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde) e na sala de experimentação do Biotério Central da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS (Protocolo n°663/2015 – ANEXO 1).

4.5 Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”

Foram utilizadas ratas *Wistar albina* da espécie *Rattus norvegicus*, fêmeas, distribuídas em 2 grupos (n=5): controle que recebeu salina (CTL SAL), e grupo tratado com extrato etanólico das folhas da cagaiteira na dose de 2000mg/kg (CTL EXT). As mesmas foram deixadas em jejum por um período de 4 horas. Após este período foi administrado, por gavagem, salina (1mL/kg) ou extrato etanólico das folhas de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) na dose de 2000mg/Kg, de acordo com os grupos (OECD, 2008). Os animais tiveram seu comportamento observado aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a realização da gavagem (ANEXO 2) e parâmetros avaliados pelo “screening” hipocrático (BRITO, 1994; OECD, 2008). Após observação comportamental, os animais tiveram seus pesos analisados durante 14 dias consecutivos e ao final deste período todos os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂ para análise macroscópica e peso de alguns órgãos vitais (fígado, rins, pulmão, coração e baço). Os dados foram expressos pelo arcoseno do peso do órgão/peso do animal.

4.6 Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes foi realizada em camundongos *Swiss*, linhagem *Mus musculus*, machos, com 6 semanas, por meio de injeção única de estreptozotocina (Sigma® - St. Louis, MO) (STZ) na dose de 150mg/kg, em camundongos em jejum de 12 a 14 horas. A STZ foi dissolvida em tampão citrato (20mM - pH 4,5), e injetada por via intraperitoneal. Os animais foram deixados em jejum por mais 3 horas após a injeção. Após um período de 7 dias, os camundongos foram novamente deixados em jejum (10 a 12 horas) e a glicemia foi medida com glicosímetro (Injex SENSII®). Os animais que apresentaram glicemia de jejum superior a 250mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos nos diferentes grupos (THANDAVARAYAN *et al.*, 2011).

4.7 Divisão dos grupos

Para formar os grupos experimentais os animais foram aleatoriamente divididos

em 4 grupos:

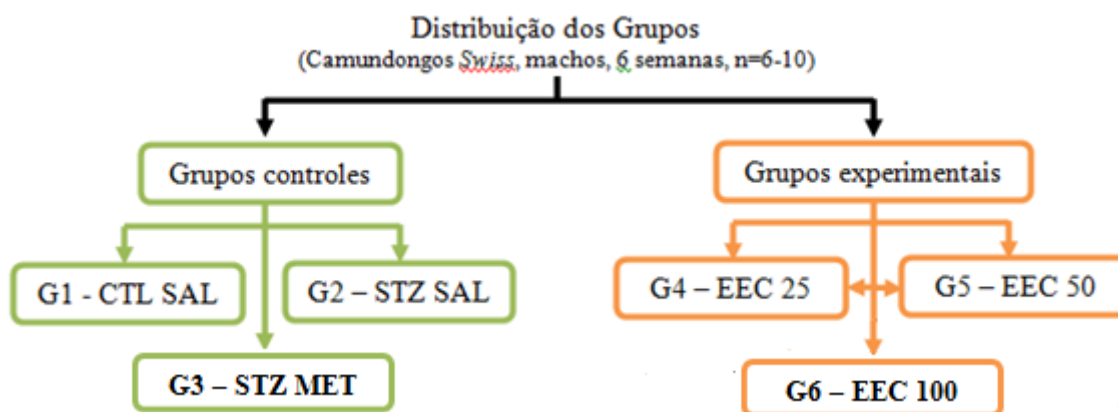


Figura 13 – G1 - CTL SAL (animais normais tratados com salina); G2 – STZ SAL (animais induzidos ao diabetes pela administração de estreptozotocina e tratados com salina); G3 - STZ MET (animais induzido ao diabetes pela administração de estreptozotocina e tratados com metformina - 500mg/dia); G4 - EEC 25 (animais induzido ao diabetes pela administração de estreptozotocina e tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira na dose de 25 mg/kg de peso do animal); G5 - EEC 50 (animais induzido ao diabetes pela administração de estreptozotocina e tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira na dose de 50 mg/kg de peso do animal); G6 - EEC 100 (animais induzidos ao diabetes pela administração de estreptozotocina e tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira na dose de 100 mg/kg de peso do animal).

4.8 Tratamento com salina e com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC)

Todos os grupos foram tratados diariamente, por 21 dias, via oral (*gavagem*), sendo que os animais CTL SAL e STZ SAL foram tratados com solução salina (0,9g NaCl/100 mL água) na dose de 1mL/kg; ao grupo tratado com metformina (*Medley*®), foi administrado 500 mg/kg de peso do animal do medicamento diluído em solução salina; e os animais do grupo STZ EXT receberam o extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC) nas doses 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal (diluído em salina). A gavagem foi realizada uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, entre 7 e 9 horas da manhã. Ao final do tratamento, os camundongos foram submetidos a jejum de 12 horas, anestesiados (xilazina – 10 mg/kg e quetamina – 80 mg/kg) e realizada a eutanásia por exsanguinação, com confirmação de morte na câmara de gás carbônico. Foram coletados sangue para análises bioquímicas, fígado e pâncreas para

análise histológica.

4.9 Avaliação da ingestão hídrica e alimentar

Animais de todos os grupos tiveram suas ingestões hídrica e alimentar mensuradas diariamente. A ingestão alimentar foi corrigida pelo peso dos animais e expressa em g/por animal.

4.10 Avaliação do peso corpóreo

Animais de todos os grupos foram pesados diariamente durante o tratamento em balança eletrônica (Camry®) e o peso corporal expresso em gramas.

4.11 Avaliação da glicemia de jejum

Animais de todos os grupos foram deixados em jejum de 10 a 12 horas e tiveram a glicemia medida com glicosímetro (Injex SENSII®), a partir da coleta de sangue na cauda, a cada sete dias do tratamento.

4.12 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Ao final do tratamento, os camundongos de todos os grupos foram deixados em jejum por um período de 12 horas. Após esse período, os animais foram anestesiados e realizado a coleta de sangue intracárdica, sendo o mesmo centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para quantificação de triglicérides, colesterol total e frações, e glicemia através de kits comerciais (LabTest®, Lagoa Santa

- GO, Brasil) e quantificados em espectrofotômetro (BioTek® – PoweWave XS).

4.13 Avaliação do peso dos órgãos

No momento da eutanásia os órgãos retirados (fígado, rim, baço, coração, pulmão, pâncreas e músculo gastrocnêmico) foram pesados em balança eletrônica semi-analítica (BelDiagnóstica®) e os valores de peso expressos em gramas.

4.14 Análise histológica do fígado e pâncreas

Após a eutanásia foram retirados o fígado e o pâncreas para a análise histológica. O material foi fixado em solução de formol a 10%, onde permaneceu até o momento da inclusão em parafina.

Após essa inclusão, foram feitos cortes de 7 µm de espessura em micrótomo e montagem em lâminas de vidro. Cada lâmina teve um total de 4 cortes retirados do bloco de parafina. As lâminas foram então coradas com hematoxilina e eosina e a análise realizada em microscópio acoplado à câmera digital em um aumento de 200x (Leica Application Suite® – Version 4.0.0). Assim, foram selecionados campos representativos no corte, onde observou-se alterações morfológicas no fígado e no pâncreas (ABBAS, 2010).

4.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *pós teste Tukey* e, para comparação de dois grupos, teste *t* de *Student*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Para a realização da análise estatística foi utilizado o

software Jandel Sigma-Stat, versão 3.5 (Systat software, Inc., USA) e Graph Pad InStat program - Version 3.02.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antioxidante, compostos fenólicos, flavonoides totais e caracterização fotoquímica

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antioxidante com β -caroteno/ácido linoleico, atividade antioxidante com o radical livre DPPH, flavonoides totais e fenóis totais (mg/g) do extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Atividade antioxidante com β -caroteno/ácido linoleico ($\mu\text{g/ml}$) e atividade antioxidante com o radical livre DPPH ($\mu\text{g/ml}$) do extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.).

Extrato etanólico das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> DC	Valores
Atividade antioxidante β -caroteno/ácido linoleico ($\mu\text{g/ml}$)	113 \pm 0,3
Atividade antioxidante com o Radical Livre DPPH ($\mu\text{g/ml}$)	107 \pm 0,1

Valores expressos por média \pm desvio padrão.

Tabela 2 - Flavonoides totais (mg/g) e fenóis totais (mg/g) do extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.), coletadas em maio/2014, em Campo Grande - MS.

Extrato etanólico das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> DC	Valores
Flavonoides totais (mg/g)	147 \pm 1,4
Fenóis totais (mg/g)	204 \pm 1,1

Valores expressos por média \pm desvio padrão.

Na análise fitoquímica, o extrato apresentou teor de quercetina de 0,9 mg/g e ácido gálico de 0,1mg/g (Figura 14).

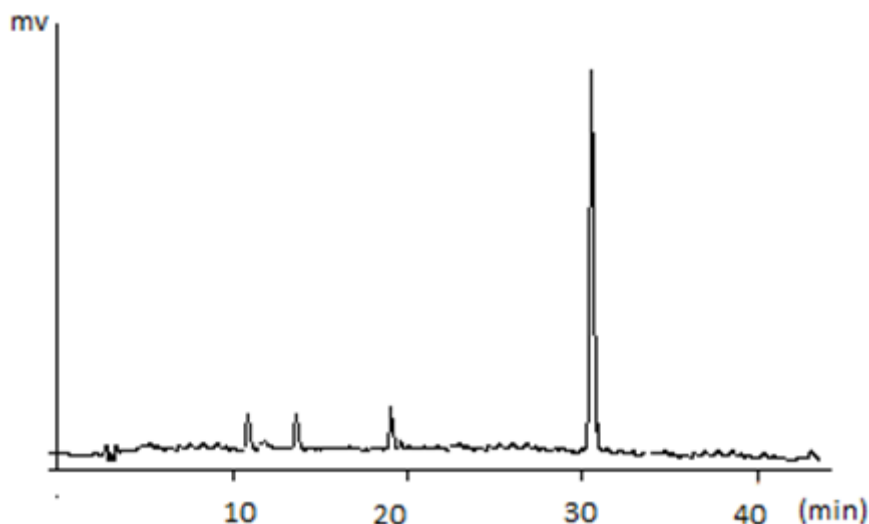


Figura 14 - Caracterização fitoquímica por análise cromatográfica (HPLC). Utilizando o padrão da Sigma (98% de pureza) o extrato apresentou aos 31,2 min quercetina e 10,5 min ácido gálico.

5.2 Teste de Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”

O extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) administrado na dose de 2000 mg/kg em animais normais (CTL EXT), não causou nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais analisados comparativamente aos animais tratados apenas com salina (CTL SAL), assim como não houve diferença no consumo alimentar e hídrico entre os grupos. Não ocorreram óbitos ao longo do período de 14 dias de observação. O peso corporal dos animais, assim como peso do fígado, baço, rins, pulmões e coração não apresentaram diferença significativa na comparação entre os grupos, além de não ter sido observada alteração macroscópica (dados não apresentados). Neste teste, foi possível verificar que o extrato obtido desta planta pertence a classe 5 (substância com dose oral letal [DL50] superior a 2000 mg/kg), sendo considerado de baixa toxicidade (OECD, 2008).

5.3 Indução de diabetes experimental

5.3.1 Avaliação da ingestão alimentar e hídrica

Ao ser avaliada a ingestão alimentar, observou-se que os animais dos grupos EEC 25 e 50 apresentaram valores semelhantes ao grupo tratado com metformina, porém a dose de 100 mg/kg do extrato provocou maior consumo alimentar, sendo a diferença significativa na primeira e última semana do estudo (Tabela 3).

Tabela 3 - Ingestão alimentar de animais controles e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas da cagaiteira.

Grupos	Ingestão alimentar (g/animal \pm S.E.M.)		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3
CTL SAL	6,23 \pm 0,61	8,66 \pm 1,41	5,94 \pm 0,46
STZ SAL	8,03 \pm 0,61	9,00 \pm 0,83	9,14 \pm 0,41 ^a
STZ MET	10,53 \pm 0,27 ^a	8,12 \pm 0,69	8,78 \pm 0,37 ^a
EEC 25	12,86 \pm 0,67 ^{a,b}	10,33 \pm 0,89	8,91 \pm 0,47 ^a
EEC 50	7,88 \pm 0,46 ^d	9,05 \pm 0,58	9,74 \pm 0,46 ^a
EEC 100	13,60 \pm 0,97 ^{a,b,c,e}	10,57 \pm 0,91	11,40 \pm 0,76 ^{a,b,c,d}

Ingestão alimentar (g/animal) de animais controles (CTL – não diabético tratado com salina/STZ SAL – diabético tratado com salina/STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas da cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso do animal, em 21 dias de tratamento. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Na mesma coluna, as letras indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CTL SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET; ^d comparado ao EEC 25, ^e comparado ao EEC 50, ^f comparado ao EEC 100. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.

Animais diabéticos tratados com o extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) apresentaram consumo hídrico superior ao grupo STZ MET ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Ingestão hídrica de animais controles e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas da cagaiteira.

Grupos	Ingestão hídrica (mL/animal \pm S.E.M.)		
	Semana 1	Semana 2	Semana 3
CTL SAL	9,64 \pm 0,35	8,93 \pm 0,74	9,64 \pm 0,35
STZ SAL	38,57 \pm 2,61 ^a	36,43 \pm 3,57 ^a	42,14 \pm 2,14 ^a
STZ MET	28,57 \pm 3,81 ^{a,b}	21,43 \pm 0,00 ^{a,b}	17,35 \pm 1,44 ^b
EEC 25	48,81 \pm 1,19 ^{a,c}	45,24 \pm 2,47 ^{a,c}	47,62 \pm 1,53 ^{a,c}
EEC 50	30,00 \pm 1,54 ^{a,d}	35,71 \pm 3,35 ^{a,c,d}	40,71 \pm 2,76 ^{a,c}
EEC 100	42,85 \pm 4,73 ^{a,c,e}	40,00 \pm 3,45 ^{a,c}	40,71 \pm 3,68 ^{a,c}

Ingestão hídrica (mL/animal) de animais controles (CTL SAL – não diabético tratado com salina/STZ SAL – diabético tratado com salina/STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso do animal, em 21 dias de tratamento. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Na mesma coluna, as letras indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CT SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET; ^d comparado ao EEC 25, ^e comparado ao EEC 50, ^f comparado ao EEC 100. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.

5.3.2 Avaliação do peso corporal

O peso dos animais controle tratados com salina (CTL SAL) e com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) nas doses 25 e 50 mg/kg apresentaram manutenção ou ganho de peso semelhante ao diabético tratado com metformina (Gráfico 1).

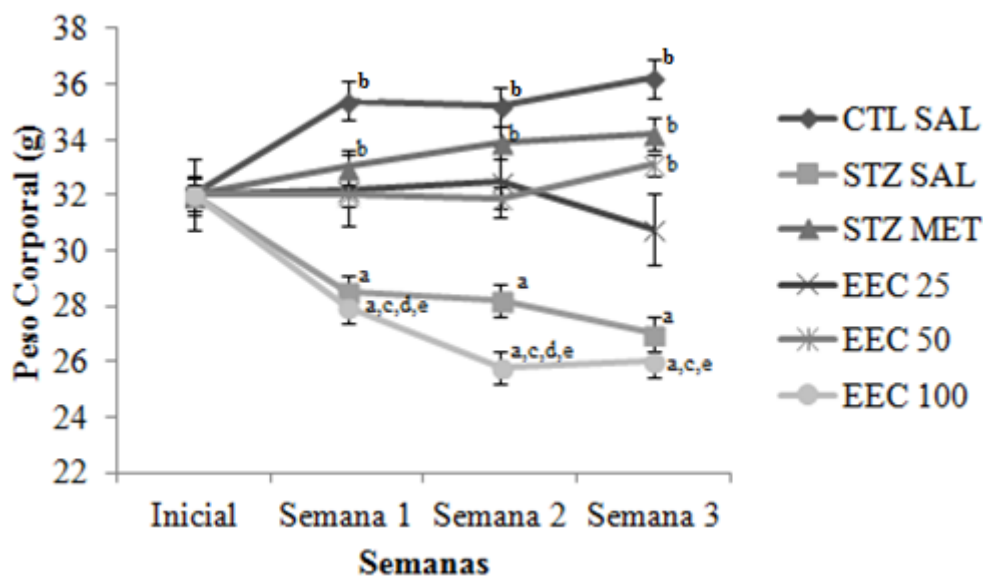


Gráfico 1 – Peso corporal (g) de animais controles (CTL SAL – não diabético tratado com salina/STZ SAL – diabético tratado com salina/STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. As letras indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CTL SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET; ^d comparado ao EEC 25, ^e comparado ao EEC 50. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.

5.3.3 Avaliação da glicemia de jejum

Os animais do grupo STZ SAL apresentaram valores de glicemia de jejum inicial estatisticamente superiores em relação aos animais do grupo controle, nos quais o diabetes não foi induzido ($p < 0,001$). Os grupos que receberam o tratamento com EEC nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg, não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos STZ SAL e STZ MET, embora os valores de glicemia se mantiveram mais altos nos grupos que receberam o extrato, independente da dose administrada, se comparados ao grupo STZ MET (Tabela 5).

Tabela 5 - Glicemia de jejum de animais controles e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira.

Glicemia de jejum (mg/dL ± S.E.M.)				
Grupos	Inicial	Semana 1	Semana 2	Semana 3
CTL SAL	127,44±7,57	127,44±6,51	104,75±4,62	101,25±4,96
STZ SAL	458,77±41,97 ^a	482,66±39,00 ^a	479,20±32,82 ^a	270,00±28,61
STZ MET	306,16±15,11 ^a	289,83±12,22 ^b	196,33±16,47 ^b	203,66±11,72
EEC 25	338,50±30,62 ^a	306,16±26,43 ^a	306,16±20,87	351,80±27,34 ^a
EEC 50	292,50±20,44 ^a	224,66±19,01 ^b	373,40±45,28 ^a	348,33±62,89 ^a
EEC 100	438,90±27,92 ^a	385,00±30,27 ^a	455,44±48,22 ^{a,c}	357,00±20,24 ^a

Glicemia de jejum (mg/dL) de animais controles (CTL – não diabético tratado com salina/STZ DM – diabético tratado com salina/ STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Valores expressos como média ± erro padrão da média. Na mesma coluna, letras indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CTL SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.

5.3.4 Avaliação do perfil lipídico sérico

Os valores de colesterol total não diferiram estatisticamente na comparação entre os grupos, embora o grupo que recebeu extrato na dose de 25 mg/kg apresentou numericamente menores valores quando comparado aos demais grupos. Quando analisado o HDL-colesterol apenas os grupos STZ MET e EEC 25 apresentavam valores aumentados com diferença estatística em relação aos demais. O oposto foi observado com o LDL -colesterol, sendo os maiores valores dessa fração visualizados no grupo CTL SAL e STZ SAL, diferindo estatisticamente dos grupos STZ MET e EEC 25 que tiveram os menores valores (Gráfico 2).

Já o VLDL-colesterol e os triglicérides estavam aumentados em animais diabéticos do grupo STZ SAL em comparação ao grupo CTL SAL, sendo encontrado uma redução significativa nos demais grupos, tanto na comparação com o grupo STZ SAL, quanto CTL SAL ($p < 0,001$).

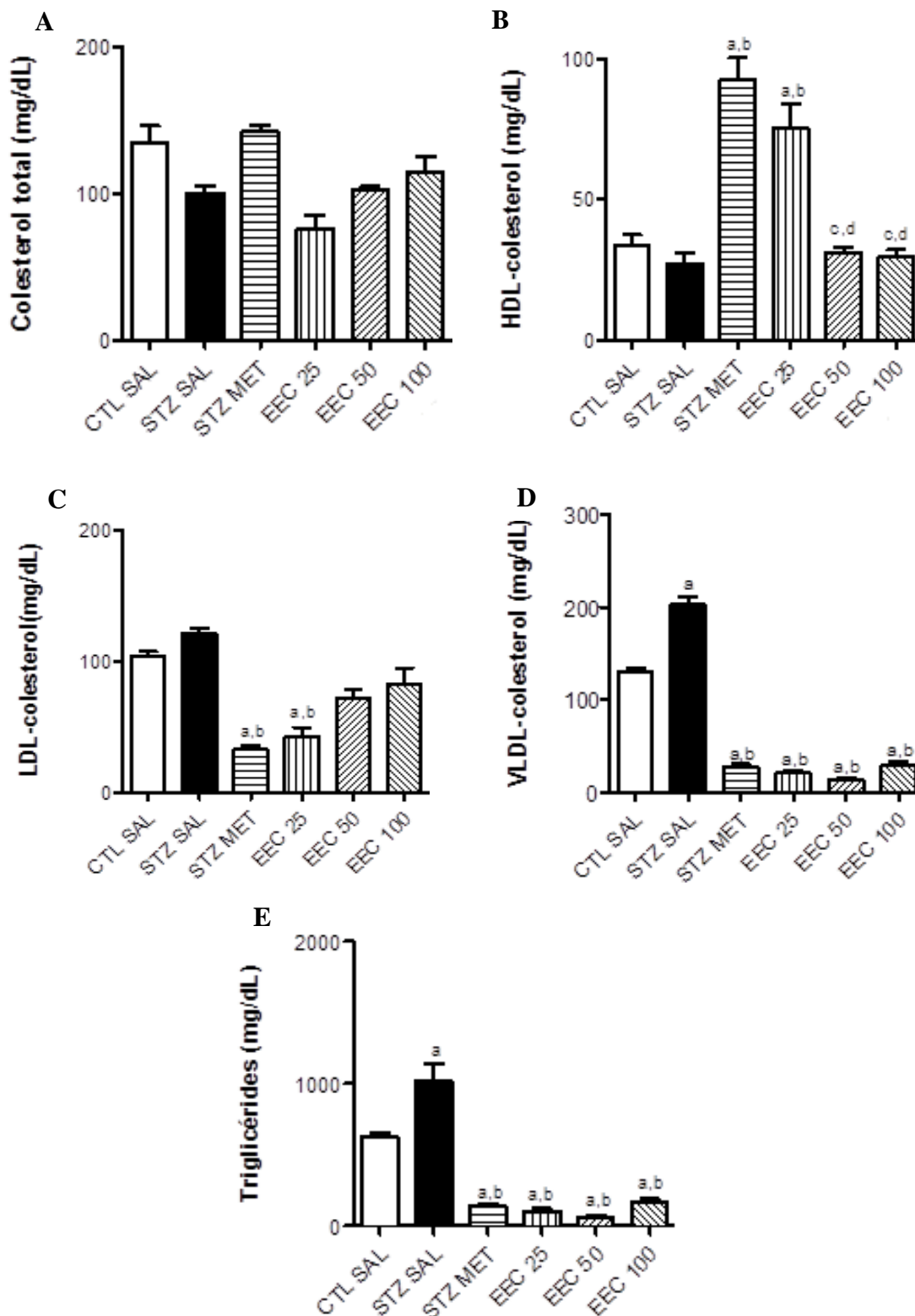


Gráfico 2 – A) Colesterol total (mg/dL); B) HDL colesterol (mg/dL); C) LDL colesterol (mg/dL); D) VLDL colesterol (mg/dL) e E) Triglicérides (mg/dL) de animais controle (CTL – não diabético tratado com salina/STZ DM – diabético tratado com salina/ STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. As letras

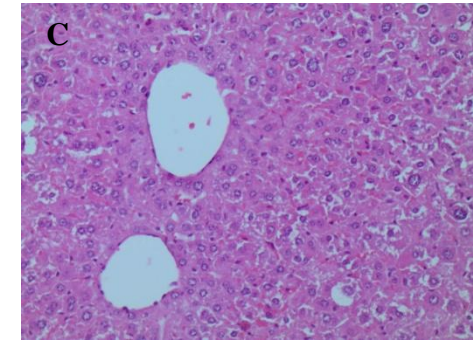
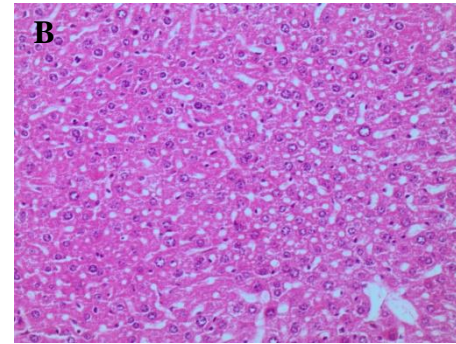
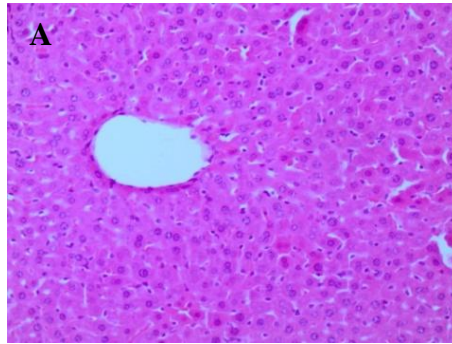
indicam diferença estatística da seguinte forma: ^a comparado ao CTL SAL; ^b comparado ao STZ SAL; ^c comparado ao STZ MET; ^d comparado ao EEC 25; ^e comparado ao EEC 50. $p < 0,05$. $n = 6-10$. ANOVA seguido de *pos test Tukey*.

Já o VLDL-colesterol e os triglicérides estiveram aumentados em animais diabéticos do grupo STZ SAL em comparação ao grupo CTL SAL, sendo encontrado uma redução significativa nos demais grupos, tanto na comparação com o grupo STZ SAL, quanto CTL SAL ($p < 0,001$).

5.3.5 Análise histológica do fígado e pâncreas

Na análise histológica do fígado foi possível verificar que os grupos que receberam extrato etanólico das folhas de cagaiteira nas doses de 25 e 50 mg/kg de peso do animal mantiveram a integralidade do tecido hepático, ou seja, compatível com o parênquima hepático normal, assim como os grupos CTL SAL e STZ MET (Figura 15). Já os grupos STZ SAL e EEC 100 apresentaram hepatócitos com aspectos normais e alguns hepatócitos com inclusões microgoticulares de lipídeo, sendo compatível com esteatose hepática microgoticular leve.

Quanto ao material histológico do pâncreas, é possível observar que os grupos STZ DM, EEC 50 e EEC 100 apresentaram ácinos pancreáticos dilatados e ilhota de Langerhans atrófica, exibindo dessa forma características compatíveis com as alterações do DM (Figura 16), demonstrando que o extrato nestas doses não impediu o atrofiamento das células pancreáticas. E os demais grupos apresentaram ácinos pancreáticos típicos com ilhota de Langerhans típica, compatível ao parênquima pancreático normal.

Grupos Controles

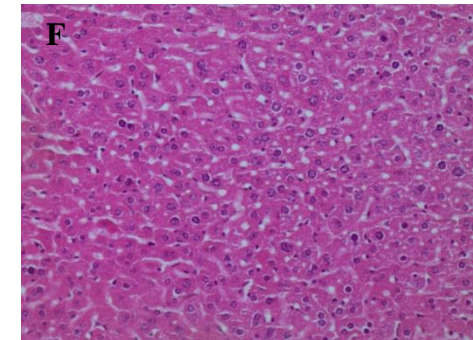
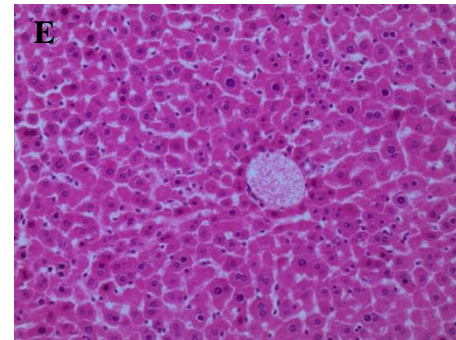
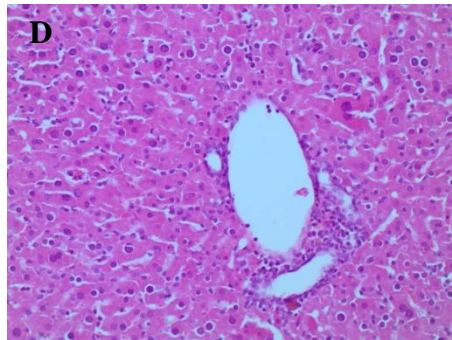
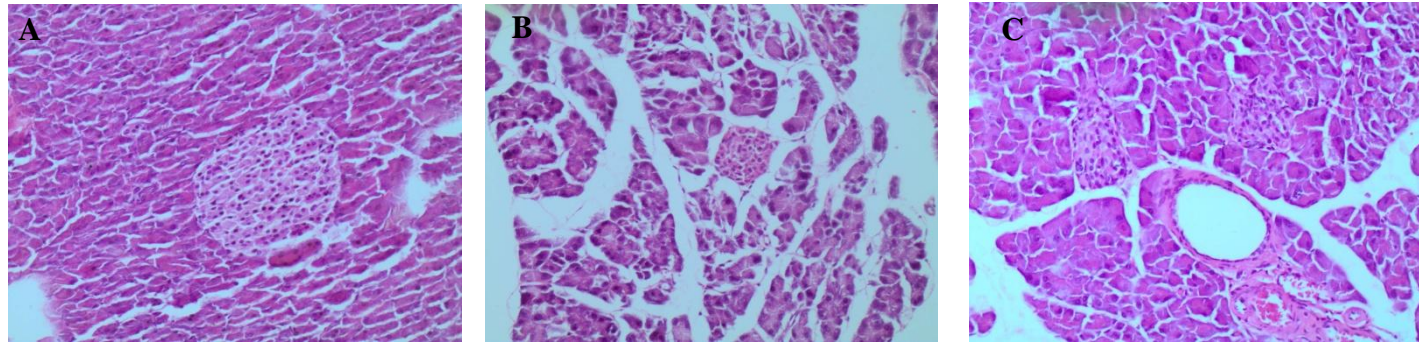
Grupos Experimentais

Figura 15 - Análise histopatológica do fígado corado pela Hematoxilina e Eosina (H&E – 200X) de animais controles (CTL – não diabético tratado com salina/STZ DM – diabético tratado com salina/ STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Sendo, A) CTL SAL – compatível com parênquima hepático normal; B) STZ DM - esteatose hepática microgoticular leve; C) STZ MET - compatível com parênquima hepático normal; D) EEC 25 - compatível com parênquima hepático normal; E) EEC 50 - compatível com parênquima hepático normal; F) EEC 100 - esteatose hepática microgoticular leve.

Grupos Controles

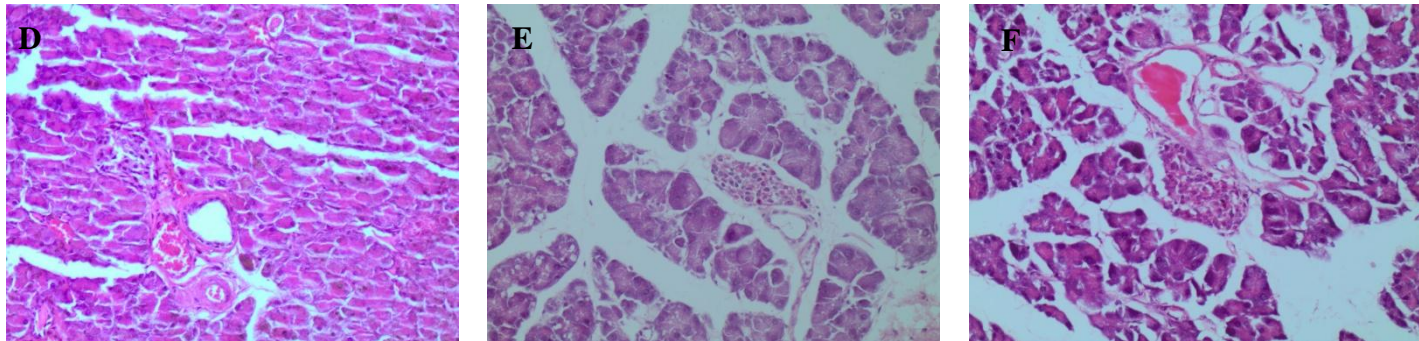
Grupos Experimentais

Figura 16 - Análise histopatológica do pâncreas corado pela Hematoxilina e Eosina (H&E – 200X) de animais controles (CTL – não diabético tratado com salina/STZ DM – diabético tratado com salina/ STZ MET – diabético tratado com metformina) e diabéticos tratados com extrato etanólico das folhas de cagaiteira (EEC) nas doses de 25, 50, 100 mg/kg de peso do animal durante 21 dias. Sendo, A) CTL SAL – parênquima pancreático normal; B) STZ DM - acinos pancreáticos dilatados, uma ilhota de Langerhans atrófica, alterações compatíveis com as alterações do diabetes.; C) STZ MET - acinos pancreáticos dilatados, uma ilhota de Langerhans atrófica, alterações compatíveis com as alterações do diabetes; D) EEC 25 - parênquima pancreático normal; E) EEC 50 - acinos pancreáticos dilatados, uma ilhota de Langerhans atrófica, alterações compatíveis com as alterações do diabetes; F) EEC 100 - acinos pancreáticos dilatados, uma ilhota de Langerhans atrófica, alterações compatíveis com as alterações do diabetes.

6 DISCUSSÃO

É descrito na literatura que as folhas da cagaiteira é empiricamente utilizada para o tratamento de diabetes, na forma de garrafadas usando álcool na preparação (SOUZA *et al.*, 2002). Além disso, Couto e colaboradores (2009) e Mahmoud e colaboradores (2001) identificaram elevadas quantidades de compostos fenólicos (flavonoides, taninos e quercetina), como também Pellegrina e colaboradores (2005) identificaram pela primeira vez na espécie ácido gálico, os quais são potentes antioxidantes que estão diretamente relacionados na reversão dos parâmetros bioquímicos alterados nas doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas dislipidemias, hipertensão arterial e no processo inflamatório em geral (DUFRESNE; FARNWORTH, 2001).

Sob nosso conhecimento, até o presente momento esse é o primeiro estudo que avaliou alterações no perfil lipídico, glicêmico e na composição corporal com o uso do extrato etanólico das folhas da cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) em modelo experimental de diabetes induzido por STZ.

A avaliação da atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides totais do extrato aqui utilizado corresponderam ao descrito na literatura (GENOVESE *et al.*, 2008; COUTO *et al.*, 2009).

Nos estudos de toxicidade, as observações clínicas, o peso dos órgãos e alterações do peso corporal podem fornecer indicadores úteis do estado de saúde geral do animal (JAHN; GUNZEL, 1997). Os animais tratados com o extrato não apresentaram manifestações comportamentais atípicas referentes ao “screening hipocrático” avaliado e também não ocorreram mortes ao longo do período de observação. Os dados obtidos neste estudo são relevantes, pois preveem a utilização desta espécie de grande importância econômica, alimentar e médica. No entanto, outros estudos baseados em protocolos elaborados por agências reguladoras devem ser realizados (tais como estudos de toxicidade subaguda, toxicidade crônica, toxicidade reprodutiva, e outros) de forma a avaliar a segurança total do uso desta planta em seres humanos.

Então, baseado na ausência de toxicidade aguda do EEC e na indicação popular das folhas de cagaiteira para tratamento do diabetes, este trabalho foi iniciado para investigar a capacidade hipoglicemiante, as alterações no perfil lipídico, na ingestão

alimentar e no peso corporal de camundongos com diabetes induzidos por streptozotocina.

O DM é caracterizado pela presença de hiperglicemia decorrente de defeitos ou falta da ação da insulina (ADA, 2011) e para reproduzir a sintomatologia do DM os estudos vêm utilizando modelo experimental de DM em roedores pelas semelhanças clínicas, laboratoriais e histológicas com o DM humano. Para a indução da doença em animais faz-se necessário à administração de drogas, como por exemplo, a streptozotocina (STZ), a qual causa hiperglicemia e hiperinsulinemia, seguida de hipoglicemia transitória e finalmente, hiperglicemia crônica, efeitos que foram demonstrados neste estudo (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003).

Depois de instalada a doença, os animais passam a apresentar alguns sintomas característicos do DM como a polidipsia. Esta surge em decorrência da hiperosmolaridade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, sendo reconhecida pelos osmorreceptores cerebrais causando como resposta sede intensa (LERCO *et al.*, 2003). O tratamento com extrato etanólico das folhas da cagaiteira não apresentou benefícios no quadro de polidipsia, provavelmente decorrente do desequilíbrio osmótico, fazendo com que se inicie um processo de desidratação.

Outro sintoma característico do diabetes, e que pode ser observado a partir do modelo de indução escolhido nesse trabalho, é a polifagia, seguida de significativa perda de peso (ADA, 2011). Tal aumento da ingestão alimentar pode estar associado ao processo regulatório da fome pelo centro da saciedade localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial, que necessita da insulina para captação da glicose. Uma vez captada, o centro da fome é inibido. Portanto, na presença de DM, ocorre ausência de insulina, o núcleo hipotalâmico ventro-medial não capta glicose e o centro da fome não é inibido, estimulando assim, a maior ingestão alimentar (JACOBSON, 1996).

Já a redução de peso se deve à perda ou degradação de proteínas estruturais, bem como aumento da lipólise, que ocorre devido à regulação do metabolismo de carboidrato e formação e armazenamento de lipídios pela insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Dessa forma, a ausência de insulina gera proteólise muscular e lipólise, contribuindo para diminuição do peso corpóreo.

Com o tratamento com extrato etanólico das folhas de cagaiteira foi possível observar menor consumo alimentar na dose de 50 mg/kg na primeira semana de tratamento. Em contrapartida, foi o grupo que recebeu dose de 100 mg/Kg que apresentou perda de peso significativa quando comparado com os demais grupos.

Quando comparados a estudos realizados com plantas da família Myrtaceae e gênero *Eugenia*, como o de Pepato e colaboradores (2001) que utilizaram o extrato das folhas da *Eugenia jambolana*, esses resultados são corroborados, pois a mesma também não apresentou efeito hipoglicemiante nos animais com DM induzidos com STZ.

Nesse modelo experimental, foi possível verificar que o extrato etanólico das folhas de cagaiteira não confirma a indicação popular, ou seja, não apresentou efeito hipoglicemiante, mesmo que a composição das folhas da cagaiteira apresentem flavonoides, como mirecetina e quercetina, que demonstraram na literatura efetividade para redução da glicemia de jejum (COUTO *et al.*, 2009). No presente estudo, esse resultado foi ratificado quando se observou a histopatologia do pâncreas, a qual apresentou, exceto nos grupos STZ MET e EEC 25, ácinos pancreáticos dilatados e atrofia das ilhotas de Langerhans, características compatíveis com as alterações do diabetes.

Em relação ao metabolismo de lipídeos, como descrito anteriormente, a deficiência de insulina no diabetes, leva a uma alteração no metabolismo lipídico, ocasionando aumento de triglicerídeos plasmáticos, provavelmente em decorrência da elevada síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos que chegam ao fígado, em virtude de maior lipólise no tecido adiposo (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Em consequência, surge intensa síntese de VLDL hepática acompanhada de um menor catabolismo da mesma pela atividade da lipase lipoproteica (JAIN; RAINS; CROAD, 2007). Por tudo isso, uma das complicações mais frequentes encontradas em pacientes com DM são as dislipidemias, que levam a graves riscos para desencadeamento de doenças cardiovasculares, principal responsável pela redução da sobrevivência de pacientes com DM, sendo considerada a causa mais frequente de mortalidade por englobar vários distúrbios vasculares (YADAV *et al.*, 2005).

No estudo em questão, todos os grupos tratados, independente da dose, promoveram redução significativa dos triglicérides e VLDL-colesterol quando comparados com os grupos CTL SAL e STZ SAL, seguindo a mesma eficácia da metformina. O estudo de Jelastin e colaboradores (2011) verificou o efeito do extrato etanólico das folhas da *Eugenia floccosa* Bedd (Myrtaceae) em ratos diabéticos, também reduzindo triglicérides ($p < 0,05$) e VLDL ($p < 0,01$) em comparação com o grupo DM tratado com salina. Nossos resultados também corroboram os achados histológicos do fígado, demonstrando presença de esteatose apenas no corte histológico dos grupos STZ DM e EEC 100.

Por meio desses resultados pode-se afirmar que o extrato possui atividade protetora em relação ao perfil lipídico sérico, uma vez que seu uso aumentou o HDL-colesterol (protetor contra doenças cardiovasculares) e diminuiu LDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides séricos, os quais em excesso podem causar ou agravar tais doenças.

Kahraman e colaboradores (2003) demonstraram em seu estudo que a ingestão de flavonoides e de outros compostos fenólicos está associada diretamente a redução dos riscos para doenças cardiovasculares. Isso decorre do fato de que tais compostos são considerados antioxidantes efetivos com capacidade de sequestrar radicais livres e quelar íons metálicos, protegendo as células dos radicais livres e da peroxidação lipídica, e também por estes agirem como estabilizador de membrana, podendo envolver processos do metabolismo intermediário (GALATI *et al.*, 2002).

Estudos voltados para a compreensão do metabolismo lipídico e o uso de flavonoides demonstraram que as concentrações plasmáticas e hepáticas de colesterol total e de triglicérides foram reduzidas enquanto o nível sérico de HDL colesterol sofreu aumento após a administração de flavonoides (MENEZES *et al.*, 2007).

Considerando que a análise do extrato etanólico das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. demonstrou a presença de flavonoides, pode-se sugerir que esses podem ter apresentado efeito no metabolismo lipídico pela atividade antioxidante, diminuindo dessa forma os triglicérides, colesterol total e LDL colesterol, seguido do aumento do HDL colesterol, especialmente na menor dose.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o EEC apresentou quantidades importantes e semelhantes aos relatos na literatura de carotenoides totais e capacidade antioxidante. E no modelo de toxicidade aguda não apresentou alterações.

No modelo de *diabetes mellitus* experimental não apresentou melhora na ingestão hídrica, em contrapartida melhorou ingestão alimentar e peso corpóreo nos animais que receberam dose de 25 e 50 mg/Kg de extrato etanólico das folhas de cagaiteira.

Não apresentou atividade hipoglicemiante, contradizendo o uso popular das folhas de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). No entanto, o uso do mesmo, particularmente na dose de 25 mg/kg, apresentou importante efeito benéfico sobre o perfil lipídico, aumentando HDL-colesterol e reduzindo LDL colesterol, VLDL colesterol e triglicérides.

Apresentando manutenção parênquima hepático (nas doses de 25 e 50 mg/Kg) e parênquima pancreático (na dose de 25 mg/kg).

Tais resultados são de extrema importância, visto a necessidade de estudos que incorporem novos agentes que controlem não apenas a glicemia no DM, mas que minimize as demais complicações da doença. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação das atividades farmacológicas evidenciadas, como também frente a outros modelos experimentais de diabetes tipo 1 e 2.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. **ROBBINS & COTRAN - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ABDEL - HASSAN, I. A.; ABDEL - BARRY, J. A.; MOHAMMEDA, S. T. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 325-330, July 2000.

ADISAKWATTANA, S.; CHANATHONG, B. Alpha-glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringa oleifera* leaf extract. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 803–808, July 2011.

ANDRADE JR, C. R. M.; CLEMENTE, E. L.; GOMES, M. B. Influência da gordura corporal em parâmetros de controle clínico e metabólico de pacientes com diabetes mellitus tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 6, n. 48, p. 885-889, dez. 2004.

ALVES, V. Pé diabético. 2006. [citado em 21 set 2007]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/denf/pediabetico>.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 562-569, Jan. 2011.

ARAÚJO, L. M. B; BRITTO, M. M. S; PORTO DA CRUZ, T. R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 44, n. 6, p. 509-518, dez. 2000.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 221-229, July 2001.

ATAÍDE, M. B. C.; DAMASCENO, M. M. C. Fatores que interferem na adesão ao autocuidado em diabetes. **Revista de enfermagem da UERJ**, v. 14, n. 4, p. 518-523, out/dez. 2006.

AYBAR, M.; RIERA, A. N. S.; GRAU, A.; SÁNCHEZ, S. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 125-132, Sept. 2001.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, n. 8, p. 553-564, Set. 1989.

BRANDÃO, M.; FERREIRA, P. B. D. Flora apícola do cerrado. **Informe Agropecuário**, v. 15, n. 168, p. 7–14, fev. 1991.

BELL, G. L.; BURANT, C. F.; TAKEDA, J.; GOULD, G.W. Structure and function of mammalian facultative sugar transporters. **Journal of Biology Chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19161-19164, Sept. 1993.

BRYANT, N. J., GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 3, n.4, p. 267–277, Apr. 2002.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental Model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 60-64, jul. 2003.

CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Hypoglycemic activity studies of some plants used in diabetes treatment in brazilian traditional medicine. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 86, n. 1, p. 11-16, July 2005.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 4, p. 419-425, ago. 2002.

CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 2, p. 213-226, Jan. 2005.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 3, n. 2, p. 877-886, Jan. 2007.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M.; LIAO, L. M., FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 111-117, Mar. 2000.

COUTO, R. O. D.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R. D. Caracterização físico química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, jul./set. 2009.

CUPPARI, L. **Guia de nutrição clínica no adulto**. 3ed. Barueri – SP : Manole, 2014.

DEVLIN, T. M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2011.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H. ; VLIETINCK, A. J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemistry and Systematic Ecology**, v. 27, n. 4, p. 445-459, June 1999.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, n. 4, p. 654-660, Dec. 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A.; MARCÍLIO, R. Bioquímica do Diabetes Melito. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; DORES, R. R. G.; FABRES, M. H. A.; NAGEM, T. J. Antidiabetic effects of the medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 19, n. 2, p. 488-500, Apr./June 2009.

DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, n. 7, p. 404-421, July 2001.

EKOÉ, J.M.; REWERS, M.; WILLIAMS, R.; ZIMMET, P. The epidemiology of diabetes mellitus. 2. ed. **Oxford**: Wiley-Blackwell, 2008.

FRANZ, M. J.; BANTLE, J. P.; BEEBE, C. A.; BRUNZELL, J. D.; CHIASSON, J. L.; GARG, A. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. **Diabetes Care**, v. 25, n. 1, p. 148-198, Jan. 2002.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J. X.; O'BRIEN, P. J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 91-104, Aug. 2002.

GENUTH, S. Type 1 diabetes mellitus. **ACP Medicine**, p. 1-19, 2008.

GENOVESE, M. E.; SILVA PINTO, M. da; SCHMIDT, A. E. S.; LAJOLO, F. M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, p. 207-214, Dec. 2008.

GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulin like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (Coriander). **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 3, p. 203-209, Mar. 1999.

GROSS, J. L.; SILVEIRA, S. P.; CAMARGO, J. L.; RECHELT, A. J.; AZEVEDO, M. J. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 1, p. 16-26, fev. 2002.

GOMES, M. B. Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 271-280, abr. 2006.

GONÇALVES, M. da C. R.; DINIZ, M. F. F. M.; DANTAS, A. H. G.; BORBA, J. D. C. Modesto efeito hipolipemiante do extrato seco de Berinjela (*Solanum melongena* L.) em mulheres com dislipidemias, sob controle nutricional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 656-663, nov. 2006.

GOLDSTEIN, L. E.; SPORN, J.; BROWN, S. New-onset diabetes mellitus and diabetic ketoacidosis associated with olanzapine treatment. **Psychosomatics**, v. 40, n. 5, p. 438-443, Oct. 1999.

GUPTA, D.; RADHAKRISHANAN, M.; KURHE, Y. Insulin reverses anxiety-like behavior evoked by streptozotocin-induced diabetes in mice. **Metabolic Brain Disease**, v. 29, n. 3, p. 729-737, Sept. 2014.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicine: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, Feb. 1996.

HSU, Y. J.; LEE, T. H.; CHANG, C. L. T. Anti-hyperglycemic and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 379- 383, Mar. 2009.

JACOBSON, A. M. Current concepts: the psychological care of patients with insulin dependent diabetes mellitus. **New England Journal Medicine**, v. 334, n. 19, p. 1249-1253, May 1996.

JADEJA, R.; THOUAOJAM, M.; SANKHARI, J.; JAIN, M.; DEVKAR, R.; RAMACHANDRAN, A. V. Standardized flavonoid-rich *Eugenia jambolana* seed extract retards in vitro and in vivo LDL oxidation and expression of VCAM-1 and P-Selectin in atherogenic rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 73-82, Aug. 2012.

JAIN, S. K.; RAINS, J. L.; CROAD, J. L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 8, p. 1124-1131, Oct. 2007.

JAHN, A. L.; GUNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reproduction of Toxicology**, v. 11, n. 1-3, p. 171-178, Mar/June 1997.

JELASTIN, K. S.; TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. Antioxidant, antihyperlipidaemic and antidiabetic activity of *Eugenia floccose* bedd leaves in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 235-240, Dec. 2011.

JENKINS, A. J.; LYONS, T. J.; ZHENG, D.; OTVOS, J. D.; LACKLAND, D. T.; MCGEE, D. Serum lipoproteins in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes intervention and complications cohort. **Diabetes Care**, n. 26, v. 3, p. 810-818, Mar. 2004.

JENMEY, A.; PROJETTO, J.; O'DEA, K.; NANKERVIS, A.; TRAIANEDES, K.; D'EMBDEN, E. Low-dose acarbose improves glycemic control in NIDDM patients without change in insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 16, n. 2, p. 499-502, Feb. 1993.

KASANICK, M. A.; PILCH, P. F. Regulation of glucose-transporter function. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 219-227, Mar. 1990.

KASIVISWANATH, R.; RAMESH, A.; KUMAR, K. E. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Gmelina asiatica* Linn. in normal and in alloxan induced diabetic rats. **Biology of Pharm Bull**, v. 28, n. 4, p. 729-732, Apr. 2002.

KAHRAMAN, A. ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTERSER, M. AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol induced gastric lesion. **Toxicology**, v. 183, n. 3, p. 133-142, Feb. 2003.

KUMARAN, A.; KARUNAKARAN, R. J. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. **Food Chemistry**, v. 96, n. 1, p. 109-114, June 2006.

KURIHARA, H.; FUKAMI, H.; KUSUMOTO, A.; TOYODA, Y.; SHIBATA, H.; MATSUI, Y.; ASAMI, S.; TANAKA, T. Hypoglycemic action of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja in normal and diabetic mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 877-880, Apr. 2003.

LAING, S. P.; SWERDLOW, A. J.; SLATER, S. D.; BURDEN, A. C.; MORRIS, A.; WAUGH, N. R.; GATLING, W.; BINGLEY, P. J.; PATTERSON, C. C. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 760-765, May 2003.

LAFOTAN, M.; LANGIN, D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 5, p. 275-297, Sept. 2009.

LAING, S. P.; SWERDLOW, A. J.; SLATER, S. D.; BURDEN, A. C.; MORRIS, A.; WAUGH, N. R. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. **Diabetologia**, v. 46, n. 6, p. 760-765, June 2003.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. A. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508 – 536, Oct. 1997.

LATHA, M.; PARI, L. Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasm insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 577-586, Apr. 2004.

LAURINDO, M. C.; RECCO, D. C.; ROBERTI, D. B.; RODRIGUES, C. D. S. Conhecimento das pessoas diabéticas acerca dos cuidados com os pés. **Arquivos Ciências e Saúde**, v. 12, n. 2, p. 80-84, abr./jun. 2005.

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

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, Feb. 2008.

LIMA, T. B.; SILVA, O. N.; SILVA, L. P.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-AS, M. F.; FRANCO, O. L. *In vivo* effects of cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) leaf extracts on diarrhea treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 1, p. 1-10, July 2011.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. *Princípios de Bioquímica*. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LEMOS, M. C. C. Dieta e dislipidemias. In: Bandeira F, editor. *Endocrinologia e diabetes*. 1ª ed: MEDSI, 2003, 1067p.

LIN, J. Y.; TANG, C. Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 140-147, Mar. 2007.

MAROO, J.; VASU, V. T.; AALINKEEL, R.; GUPTA, S. Glucose lowering effect of aqueous extract of *Encostemma littorale* Blume in diabetes: a possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 3, p. 317-320, 2002.

MAI, T. T.; CHUYEN, N. V. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 69-76, Aug. 2007.

MALERBI, D.; FRANCO, L. J. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30 a 69 years. **Diabetes Care**. v. 15, n. 11, p. 1509-1516, Nov. 1992.

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

MCLELLAN, K. C. P.; BARBALHO, S. M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A. C. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 515-524, set./out. 2007.

MAHMOUD, I. I; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R.; HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v. 57, n. 8, p. 1239-1244, Dec. 2001.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian Bauhinia species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, Jan./Mar. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS. Sistema de Informações sobre Mortalidade. Mortalidade Brasil

[Internet]. 2010 [citado 2015 abr 5]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL/MS)**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: 2015.

MORAES, D. E.; FREITAS, I. C. M. de; GIMENO, S. G. A.; MONDINI, L. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP. **Caderno de Saúde Pública**. v. 26, n. 5, p. 929-941, maio 2010.

MORAIS, G. F. C.; SOARES, M. J. G. O.; COSTA, M. M. L.; SANTOS, I. B. C. The diabetic in face of treatment, risk factors and chronic complications el diabetics. **Revista de enfermagem da UERJ**, v. 17, n. 2, p. 240-245, abr./jun. 2009.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M.; SANTOS, T. S. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, v. 15, n. 1, p. 68-70, Mar. 1983.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações – 5. Ed- Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

NAGARAJAN, N. S.; MURUGESH, N.; KUMARESAN, P. T.; RADHA, N.; MURALI, A. Antidiabetic and antihyperlipemic effects of *Cleomea felina*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 310-315, June 2005.

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

NISHIMURA, R.; LAPORTE, R. E.; DORMAN, J. S.; TAJMA, N.; BECKER, D.; ORCHARD, T. J. Mortality trends in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 5, p. 823-827, May 2001.

OBOH, G.; ADEMILUYI, A. O.; FALOVE, Y. M. Effect of combination on the antioxidant and inhibitory properties of tropical pepper varieties against α -amylase and α -glucosidase activities in vitro. **Journal of Medicinal Food**. v. 12, n. 10, p. 1152-1158, Oct. 2011.

ONKAMO, P.; VÄÄNÄNEN, S.; KARVONEN, M.; TUOMILEHTO, J. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes: the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**. v. 42, n. 12, p. 1395-1403, Dec. 1999.

OLIVEIRA FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793-810, Mar. 2000.

OLIVEIRA, A. M.; HUMBERTO, M. M. S; SILVA, J. M.; ROCHA, R. F. A.; SAAE, G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da

casca, do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 618-624, dez. 2006.

OECD, 2008. OECD Guideline for testing of chemicals: acute oral toxicity – acute toxic class method, n° 425, 3-4.

PARISI, M. C. R. Úlceras no pé diabético. In: JORGE, A.S.; DANTAS, S. R. P. E. Abordagem multiprofissional ao tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu; 2003. p.311-317

PELLEGRINA, C. D.; PADOVANI, G.; MAINENTE, F.; ZOCCATELLI, G.; BISSOLI, G.; MOSCONI, S.; VENERI, G.; PERUFFO, A.; ANDRIGHETTO, G.; RIZZI, C.; CHIGNOLA, R. Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. *Cancer Lett*, n. 226, v. 1, p. 17-25, Aug. 2005.

PEPATO, M. T.; FOLGADO, V. B. B.; KETTELHUT, C.; BRUNETTI, L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 3, p. 389-395, Mar. 2001.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, n. 1, p. 57-109, Mar. 2003.

RIZZINI, C. T. Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3., 1971, São Paulo. [Anais...]. São Paulo: E. Blucher: EDUSP, 1971. p. 61-64.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, mar. 2007.

RUBIN, E. Rubin patologia: bases clinicopatológicas da medicina / editor-chefe Emanuel Rubin. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SANTOS, R. F.; NORMIZO, R.; WAJCHENBERGA, B. L.; REAVEN, G.; AZHAR, S. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes. **Diabètes & Métabolism**, v. 21, n. 4, p. 274-280, Oct. 1995.

SANTOS, D.R. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 77, n. 3, p. 1-48, jul. 2001.

SANTOS, H. V.; FONSECA, J. M.; FREITAS, R. F.; ROYO, V. A. Caracterização laboratorial das dislipidemias e o uso de fitoterápicos. **Revista Multitexto**, v. 3, n. 1, p. 21-28, fev. 2015.

SEGAL, P. Efficacy and safety of miglitol therapy compared with glibenclamide in patients with NIDDM inadequately controlled by diet. **Diabetes Care**, v. 20, n. 5, p. 687 - 691, May 1997.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 87, n. 1, p. 04-14, Jan. 2010.

SHAMAR, S. B.; RAIPOOT, R.; NASIR, A.; PRABHU, K. M. MURTHY, P. S. Ameliorative effect of active principle isolated from seeds of *Eugenia jambolana* on carbohydrate metabolism in experimental diabetes. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 7, p. 353-359, Feb. 2011.

SIBLEY, S.D.; PALMER, J.P.; HIRSCH, I.B.; BRUNZELL, J.D. Visceral obesity, hepatic lipase activity, and dyslipidemia in type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. 88, v. 7, p. 3379-3384, July 2003.

SOEDAMAH-MUTHU, S. S.; FULLER, J. H.; MULNIER, H. E.; RALEIGH, V. S.; LAWRENSEN, R. A.; COLHOUN, H. M. High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database. **Diabetes Care**, n. 29, v. 4, p. 798-804, Apr. 2004

SOUZA, P. M.; ELIAS, E. T.; SIMEONI, L. A.; PAULA, J. E.; GOMES, M. S.; GUERRA, E. N. S.; FONSECA, Y. M.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. Plants from brazilian cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-7, Nov. 2012.

STEINER, D. F.; CHAN, S. J.; WELSH, J. M.; KWOW, S. C. M. Structure and evolution of the insulin gene. **Annual Review of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 463-484, May 1985.

STUMBOLL, M.; GERICH, J. Clinical features of insulin resistance and beta cell dysfunction and the relationship to type 2 diabetes. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 21, n. 1, p. 31-51, Mar. 2001.

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

THANDAVARAYAN, R. A.; GIRIDHARAN, V. V.; SARI, F. R.; ARUMUGAM, S.; VEERAVEEDU, P. T.; PANDIAN, G. N.; PALANIYANDI, S. S.; MA, M.; SUZUKI, K.; GURUSAMY, N.; WATANABE, K.. Depletion of 14-3-3 Protein Exacerbates Cardiac Oxidative Stress, Inflammation and Remodeling Process via Modulation of MAPK/NF- κ B Signaling Pathways after Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus, **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 5, p. 911-922, Dec. 2011.

TEPE, B.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, B.; POLISSIOU, M. Antimicrobial and antioxidante activity of the essential oil and various extracts of *Cyclothrichium origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 1, p. 335-342, July 2005.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, May 2004.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, Nov. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, World Health Organization, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on noncommunicable diseases 2010 [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2015 Apr 5]. Available from: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/.

WU, T.; ZHOU, X.; DENG, Y.; JING, Q.; LI, M.; YUAN, L. In vitro studies of *Gynura divaricata* (L.) DC extracts as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 305-308, June 2011.

XIE, J. T.; WANG, C. Z.; WANG, A. B.; WU, J.; BASILA, D.; YUAN, C. S. Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*. **Acta Pharmacologia Sinica**, v. 26, n. 9, p. 1104-1110, Sept. 2005.

YADAV, U. C.; MOORTHY, K.; BAQUER, N. C. Combined treatment of sodium orthovanadate and *Mormodica charantia* fruit extract prevents alterations in lipid profile and lipogenic enzymes in alloxan diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 268, n. 1, p. 111-120, Jan. 2005.

YEAMAN, S. J. Hormone-sensitive lipase-new roles for an old enzyme. **Journal of Biochem**, v. 1, n. 379, p. 11-22, Apr. 2004.

ZAVALA, A.V.; BRAVER, D. Semiologia do pé: prevenção primária e secundária do pé diabético. **Revista de Diabetes Clínica**, v. 4, n. 1, p. 135-142, mar. 2000.

ANEXO 1




Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 663/2015 da Pesquisadora Karine de Cássia Freitas Gielow, referente ao projeto de pesquisa "Eficácia do extrato etanólico de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) em camundongos diabéticos", está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 30 de março de 2015.


Maria Araújo Teixeira
Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 30 de março de 2015.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

ANEXO 2

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Data: ____/____/2015

Sintomas	Normal	Tempos				
		30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
Aparência geral	4					
Frênilo vocal	0					
Irritabilidade	0					
Resposta ao toque	4					
Aperto da cauda	4					
Contorção	0					
Trem posterior	0					
Endireitamento	4					
Tônus muscular	4					
Força de agarrar	4					
Ataxia	0					
Reflexo articular	4					
Reflexo corneal	4					
Tremores	0					
Convulsões	0					
Estimulações	4					
Straub	0					
Hipnose	0					
Anestesia	0					
Lacrimação	0					
Ptose	0					
Micção	4					
Piloereção	0					
Defecação	4					
Hipotermia	0					
Respiração	4					
Cianose	0					
Morte						

Códigos:

- Teste com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 à 4.
- Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 à 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 à 8 quando ocorrer aumento.

Fonte: Brito (1994)

ANEXO 3

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental*Eugenia dysenterica* DC. – dose 2000mg/Kg**Data: 06/05/2015**

Sintomas	Normal	Tempos				
		30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
Aparência geral	4	4	4	4	4	4
Frênilo vocal	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	4	4	4	4	4	4
Aperto da cauda	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0
Reflexo articular	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0
Micção	4	4	4	4	4	4
Piloereção	0	0	0	0	0	0
Defecação	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	0	0	0	0	0
Respiração	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0
Morte		0	0	0	0	0

Códigos:

- Teste com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 à 4.
- Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 à 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 à 8 quando ocorrer aumento.