



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO SANGUÍNEO E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PÂNCREAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS E NÃO
DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATO DE *Vochysia rufa* E FASEOLAMINA**

Aluno: Neire Moura de Gouveia

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Karen Calábria

UBERLÂNDIA - MG
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO SANGUÍNEO E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PÂNCREAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS E NÃO
DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATO DE *Vochysia rufa* E FASEOLAMINA**

Aluno: Neire Moura de Gouveia

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Karen Calábria

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Bioquímica
(Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G719a
2012

Gouveia, Neire Moura de, 1984-

Avaliação do controle glicêmico sanguíneo e do estresse oxidativo em pâncreas de animais diabéticos induzidos e não diabéticos tratados com extrato de *Vochysia rufa* e faseolamina / Neire Moura de Gouveia. -- 2012. 119 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

Coorientadora: Luciana Karen Calábria.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Diabetes - Teses. 3. Estresse oxidativo - Teses. 4. Produtos naturais - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Calábria, Luciana Karen. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO SANGUÍNEO E DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM PÂNCREAS DE ANIMAIS DIABÉTICOS INDUZIDOS E NÃO
DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATO DE *Vochysia rufa* E FASEOLAMINA**

ALUNO: Neire Moura de Gouveia

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira – UNB
Prof. Dr. José Antônio Galo – UFU/ *Campus* Uberlândia
Profa. Dra. Maria Lúcia Pedrosa - UFOP
Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes – UFU/ *Campus* Patos de Minas

Profa. Dra. Luciana Karen Calábria – UFJF/*Campus* Governador
Valadares
Prof. Dr. Morun Bernardino Neto – UFU/*Campus* Uberlândia

Data da Defesa: 22/08/2012

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PPGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Cerrado a maior riqueza do Brasil

Letra: Neire Moura/Thais Moura

Melodia: Thais Moura

C G C F G C 2X
C

Um lugar que tem tantas belezas e muitas riquezas chamado Brasil.

G F C

Uma delas é a natureza que abrange grande parte do país.

G F C

O cerrado é uma parte dela, que tem sua vegetação retorcida. Com a magia do

G F C C7

fogo suas sementes, brotam deste chão de cinzas.

F C

A vegetação deste bioma é tão linda.

F C

Tudo isso só pode ser criação Divina.

G F

Berço de muitas inspirações;

G F G C

Centro de rimas da música caipira.

F C

Lobo -guará, tamanduá;

G F C G F Em Dm C

Curió, curiango e jaguatirica.

G F C

Mas como as plantas do cerrado são humildes;

G F

Um exemplo é o ipê amarelo;

G F G C

que perde suas folhas para se florir cheio de vida.

G F C

Os pássaros cantam vibrantes ao amanhecer da aurora

G F G F G C

As gotas de orvalho desaparecem, a vida recomeça com uma nova história.

F G F

Ao chegar o pôr do sol as cigarras anunciam aqui que a noite está perto

C G F C

Agora sim a noite chegou, animais dormem e outros aparecem.

G F C

Corujas, lobos, caçam animais silvestres.

F G C Bb G C G C

Cerrado a maior riqueza do Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelos dons do Espírito Santo, que me deu generosamente, sabedoria e força para finalizar este trabalho.

Familiares...

Aos meus amados pais Ronaldo e Rosemeire pelo amor incondicional, por muitas vezes deixarem seus sonhos para realização dos meus. Meu alicerce e exemplo de dignidade. Na escola da vida vocês são doutores, essa conquista é nossa.

À minha ídola e irmã Thais Moura pelo companheirismo e exemplo de força e determinação.

Aos meus tios Ronivaldo e Luciene, meus primos Thiago e Matheus por me acolherem em seu lar me adotando como membro da família.

Aos meus avós paternos José e Antônia e maternos Anadir e Divina por sempre acreditarem que eu podia ir mais longe, pelo amor inestimável, me dando força para realizar este trabalho. Amo vocês!!!!

Aos meus familiares pelo apoio, paciência e ter entendido meus momentos de afastamento.

Amigos...

A minha segunda mãe, conselheira e amiga Maria Iêda Alves Pacheco por ter me acolhido em seu lar como um membro de sua família. E as minhas irmãs "tortas" Aline e Amanda pelos conselhos, companheirismo e acolhimento.

Ao Dr. Fauzi Palis Junior e Maria Eugenia Cancelli por me ensinarem a enxergar possibilidades aonde não há mais o que fazer e por me ajudarem a permanecer de pé perante os obstáculos na realização deste trabalho.

As amigas Simone Deconte e Alice Costa pela força, apoio, companheirismo e momentos de descontração.

Ao meu saudoso amigo Clênio Guimarães pelos conselhos inestimáveis e momentos de alegria, que Deus o tenha e essa vitória é nossa.

Colaboração...

Ao meu orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola por acreditar no meu potencial e me dar asas para voar tanto na extensão como na pesquisa. Obrigada pela dedicação nestes seis anos sempre preocupado com minha formação me dando oportunidade de participar na elaboração de projetos, administração de recursos, avaliação de trabalhos, ministrar cursos, palestras e oficinas, onde hoje posso dizer que tenho competência para iniciar minha carreira profissional. Muito obrigada por tudo!!!!!!

A minha querida irmã, amiga e co-orientadora Profa. Dra. Luciana Karen Calábria por dividir seus conhecimentos comigo, me incentivando, apoiando e permitindo a execução deste trabalho e por me fazer enxergar o infinito. Minha gratidão e admiração serão eternas.

Ao Dr. Ricardo Rodrigues e ao senhor Donizete por dividirem sua experiência sobre o uso popular da *Vochysia*.

Ao Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim e o técnico Felipe Cesar Gonçalves da Faculdade de Medicina veterinária/UFU pela realização das análises bioquímicas.

À técnica do Centro Bioterismo da UFU Taisa Carrijo de Oliveira pelo apoio.

Ao grande amigo Prof. Dr. Morun Bernardino Neto do Instituto de Genética e Bioquímica/UFU que não hesitou em dividir seu conhecimento estatístico e alguns finais de semana de trabalho.

Aos Prof. Dr. Alberto de Oliveira e a doutoranda Raquel de Souza do Instituto de Química/UFU pelo apoio no estudo fitoquímico.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Belletti do Instituto de Ciências Biomédicas/UFU pelo apoio nas análises histológicas, permitindo a utilização dos Laboratórios de histologia

Aos técnicos Fabricio e Ester pelo carinho e acolhimento no Laboratorio de histologia.

Ao Prof. Sérgio Cardoso e Adriano Loyola por permitirem a utilização do Laboratório de Patologia.

Aos Profs. Dr. Eduardo Antonio Ferreira e Dra. Rosangela Pedrosa da UFSC por fornecerem os protocolos de estresse oxidativo e pelo apoio técnico.

Aos meus queridos "neiretes", ou seja, co-orientados, Danúbia Carvalho, Aline Rodovalho e Izabela Moraes por me permitirem aprender e ensinar.

Ao grupo *Vochysia*, Douglas, Helen Machado, Alice Costa, Luciana Calábria, Francielle, Izabela Moraes, Camilla Manzan, Prof. Dr. Alexandre Azenha e Aline Rodovalho que me ensinaram que o trabalho em equipe se torna menos árduo e mais prazeroso.

Aos ICs Aline Borges Rodovalho e Tiago Daniel Madureira de Medeiros pelo empenho nas análises histológicas e revisão das referências bibliográficas.

As queridas Helen Machado e Alice Costa pela paciência e empenho na revisão do capítulo 1.

Aos estagiários Eduardo, Maressa e Laura por me ajudarem nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Renata, Leo, Olga, Miguel, Alisson, Bianca, Renato e Vinícius pela amizade.

A amiga Rosilene Aguiar que em tão pouco tempo me cativou pelo seu companheirismo na bancada.

Aos Profs Luiz Ricardo Goulart, João Marcos Madurro e Ana Grayce Madurro pela elaboração do projeto Rede Nanobiotec que resultou na minha bolsa de doutorado.

Ao secretário da Pós-graduação Gerson Fraissat pela amizade e reflexões.

Aos amigos, funcionários e professores do Instituto de Genética e Bioquímica pela amizade e colaboração.

À amiga e companheira Vilma Lúcia Moura por dividir seus conhecimentos e o trabalho extensionista.

A todas as crianças, jovens, idosos e profissionais que participaram das atividades de extensão da Rede Fitocerrado obrigada por me ensinarem a ser mais humana e consciente. Não há nada mais fabuloso do que a sabedoria popular. Pessoas sábias que por mera observação ou por atenção a vida cotidiana encontram a felicidade na simplicidade e não se deixam levar pela vaidade.

Apoio...

À Pro-reitoria de extensão pelo trabalho conjunto e apoio na execução dos projetos de extensão, que culminaram na pesquisa e realização deste trabalho.

Ao Deputado Gilmar Machado pelo apoio nos projeto de extensão que proporcionou recursos para minha formação.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPEMIG.

À Rede Fitocerrado pelo apoio financeiro.

Enfim, impossível citar todas as pessoas que fizeram parte dessa história, mas deixo meu sincero agradecimento a todos que me apoiaram e me deram força para vencer mais essa etapa da minha vida, pois as minhas maiores conquistas foram às novas amizades as experiências vividas.

Muito Obrigada!!!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

Apresentação	1
Capítulo 1	
1. Fundamentação Teórica	7
1.1 Epidemiologia do Diabetes mellitus	7
1.2 Diabetes mellitus	8
1.3 Fisiopatologia do diabetes e suas complicações	9
1.4 Diabetes experimental	11
1.5 Formação de espécies reativas de oxigênio	12
1.6 Defesas antioxidantes	18
1.6.1 Antioxidantes enzimáticos	19
1.6.2 Antioxidantes não enzimáticos	21
1.7 Diabetes e o estresse oxidativo	21
1.8 Tratamento do diabetes	24
1.9 <i>Vochysia rufa</i> Mart	26
1.10 Faseolamina	28
2. Referências	29
Capítulo 2	
Artigo científico: <i>“Evaluation of antidiabetic and antioxidant effects of Vochysia rufa Mart. extract in pancreas of the non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats.”</i>	42
Capítulo 3	
Artigo científico: <i>“Phaseolamin, an alpha-amylase inhibitor, improves antioxidant capacity in the pancreas of the non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats.”</i>	78
Capítulo 4	
Artigo de extensão: <i>“Integração Universidade e Sociedade: relato de experiência em atividades de ensino, pesquisa e extensão com plantas medicinais”</i>	92

APRESENTAÇÃO

O formato desta tese obedece às normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Ela é composta de quatro capítulos, sendo o capítulo 1 referente à fundamentação teórica, que embasa os capítulos 2 e 3.

Capítulo 1 - Fundamentação Teórica.

Capítulo 2 - Evaluation of antidiabetic and antioxidant effects of *Vochysia rufa* Mart. extract in pancreas of the non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats.

Capítulo 3 – Phaseolamin, an alpha-amylase inhibitor, improves antioxidant capacity in the pancreas of the non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats.

Capítulo 4 - Integração Universidade e Sociedade: relato de experiência em atividades de ensino, pesquisa e extensão com plantas medicinais.

Os capítulos 2 e 3 foram escritos no formato de um artigo científico, em inglês. Cada artigo representa o estudo na íntegra, está formatado dentro das normas das revistas citadas nos seus referentes capítulos, e após as considerações dos membros da banca e a defesa da tese foram submetidos para publicação.

RESUMO

O diabetes mellitus é uma doença crônica que causa hiperglicemia, devido à deficiência na produção de insulina ou a utilização ineficaz da insulina que é produzida. Faseolamina é uma glicoproteína extraída a partir das sementes de *Phaseolus vulgaris* responsável por inibir a atividade da enzima alfa-amilase. Faseolamina tem sido comercializada e prescrita para reduzir a glicemia e o peso corporal em humanos, embora haja contradições quanto à sua eficácia. Por outro lado, *Vochysia rufa* popularmente conhecida como "quina-doce" tem sido usada na medicina popular para tratar a diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 em Uberlândia, Brasil. O mecanismo de ação e o perfil fitoquímico da espécie estudada é desconhecido. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antidiabético e antioxidante do extrato de *V. rufa* (V) e uma amostra de faseolamina comercial (P) sobre os parâmetros bioquímicos, antioxidantes e histológicos em ratos não-diabéticos (ND) e diabéticos induzidos por estreptozotocina (D) ratos durante 43 dias. A fitoquímica preliminar do extrato de *V. rufa* revelou a presença de proteínas e triterpenóides. Os animais receberam água (ND grupos controle e D), extrato de *V. rufa* (500 mg / kg) (NDV e grupos DV), faseolamina (500 mg / kg) (grupos NDP de e DP) e glibenclamida (6 mg / kg) (NDG e grupos DG) e acarbose (25mg/kg) (NDA e grupos DA) como um drogas controle, respectivamente, vai gavage. Grupos DV, NDP, DV e DP não apresentaram redução no peso corporal quando comparados com os grupos controles (glibenclamida, água e acarbose). No entanto, NDV, NDP, DV e DP, bem como NDG e DG ratos reduziram os níveis glicêmicos quando comparados antes e após o tratamento. Ratos NDV aumentaram os níveis de uréia ($P < 0,05$) e aspartato aminotransferase (AST) ($P < 0,001$) em comparação o controle. DV em relação ao grupo D diminuiu os níveis de AST ($P < 0,05$), ALT ($P < 0,05$) e HDL-C ($P < 0,05$), enquanto DG comparado ao grupo D aumentou os níveis de ácido úrico ($P < 0,01$), creatinina ($P < 0,05$) e diminuiu os níveis de fosfatase alcalina (ALP) ($P < 0,01$). DP ratos aumentaram significativamente os níveis de ácido úrico ($P < 0,01$), creatinina ($P < 0,05$) e uréia ($P < 0,01$) em comparação com os níveis de ratos D. O nível da fosfatase alcalina (ALP) ($P < 0,05$) diminuiu significativamente em DP quando comparado com os ratos D. NDP semelhante aos ratos NDA aumentaram os níveis de, uréia ($P < 0,01$) e ALT ($P < 0,05$). Portanto, o exgtrato de

Vochysia rufa foi capaz de reduzir a glicemia e aliviou os efeitos renais e hepáticas observadas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, assim como a amostra de faseolamina pode causar danos às funções renais e hepáticas.

Palavras chaves: Diabetes, estresse oxidativo, produtos naturais.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease that causes hyperglycemia due to deficiency in insulin production or ineffective use of the insulin that is produced. Phaseolamin is a glycoprotein extracted from *Phaseolus vulgaris* seeds accountable for inhibiting the activity of the enzyme alpha-amylase. Phaseolamin has been marketed and prescribed for reducing blood glucose and body weight in humans, although there are contradictions as to their effectiveness. On the other hand, *Vochysia* drums popularly known as "sweet corner" has been used in folk medicine to treat diabetes mellitus type 1 and type 2 in Uberlandia, Brazil. The mechanism of action and the phytochemical profile of the studied species is unknown. The aim of this study was to evaluate the anti-diabetic and antioxidant potential of *V. rufa* extract (V) and a sample of commercial phaseolamine (P) on the biochemical, antioxidants and histological parameters in non-diabetic rats (DN) and diabetic streptozotocin-induced (D) mice for 43 days. The primary drums *V. rufa* phytochemical extract showed the presence of proteins and triterpenoids. The animals received water (ND control groups and D), *V. rufa* drums extract (500 mg / kg) (NDV and DV groups), phaseolamine (500 mg / kg) (NDP and PD group) and glyburide (6 mg / kg) (NDG and DG groups) and acarbose (25mg / kg) (NDA and DA groups) as a control drug, respectively, will gavage. DV groups, NDP, DV and DP showed no reduction in body weight compared to control groups (glibenclamide, water and acarbose). However, NDV, NDP, DV and DP, as well as NDG DG rats and reduced glucose levels compared before and after treatment. Group NDV increased urea levels ($p < 0.05$) and aspartate aminotransferase (AST) ($P < 0.001$) compared to control. DV compared to group D decreased the levels of AST ($P < 0.05$), ALT ($P < 0.05$) and HDL-C ($P < 0.05$) as compared to group D, DG increased acid levels uric ($P < 0.01$), creatinine ($P < 0.05$) and decreased alkaline phosphatase levels (ALP) ($P < 0.01$). SD rats significantly increased uric acid levels ($P < 0.01$), creatinine ($P < 0.05$) and urea ($P < 0.01$) compared with mice the levels of D. The level of alkaline phosphatase (ALP) ($P < 0.05$) decreased significantly in PD rats compared with rats D. NDP similar to the NDA increased levels of urea ($P < 0.01$) and ALT ($p < 0.05$). Therefore, the extracto of *Vochysia* was able to reduce blood glucose and alleviated the renal and hepatic effects observed in

streptozotocin-induced diabetic rats as well as the sample phaseolamine can cause damage to liver and kidney functions.

Key words: Diabetes, oxidative stress, natural products.

Capítulo 1

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Epidemiologia do Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* (DM) é considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A crescente incidência e prevalência são atribuídas ao envelhecimento populacional, aos avanços terapêuticos no tratamento da doença, mas, especialmente, ao estilo de vida atual, caracterizado por inatividade física e hábitos alimentares que predispõem ao acúmulo de gordura corporal (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011). Segundo dados da World Health Organization (WHO) em 2011 cerca de 346 milhões de pessoas no mundo apresentavam diabetes (Figura 1).

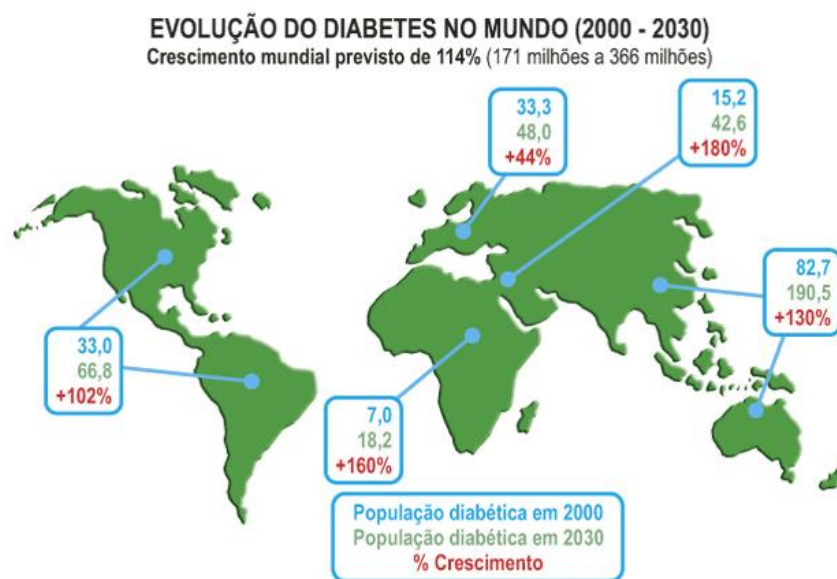


Figura 1: Evolução do diabetes no mundo (2000 – 2030). Fonte: WHO, 2011.

Em 2004, cerca de 3,4 milhões de pessoas morreram devido aos níveis elevados de glicose no sangue. Além disso, mais de 80% das mortes por DM ocorrem em países de baixa e média renda. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2005, no Brasil, a população com idade

igual ou superior a 40 anos com tolerância à glicose diminuída era de 11%, o que representava cerca de 5 milhões e meio de portadores. A WHO estima que mortes causadas por diabetes dupliquem entre 2005 e 2030. No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) vem progressivamente atendendo desde 1994 um número crescente de pessoas com DM. A figura 2 mostra a evolução destes atendimentos no período de 1998 a 2004.

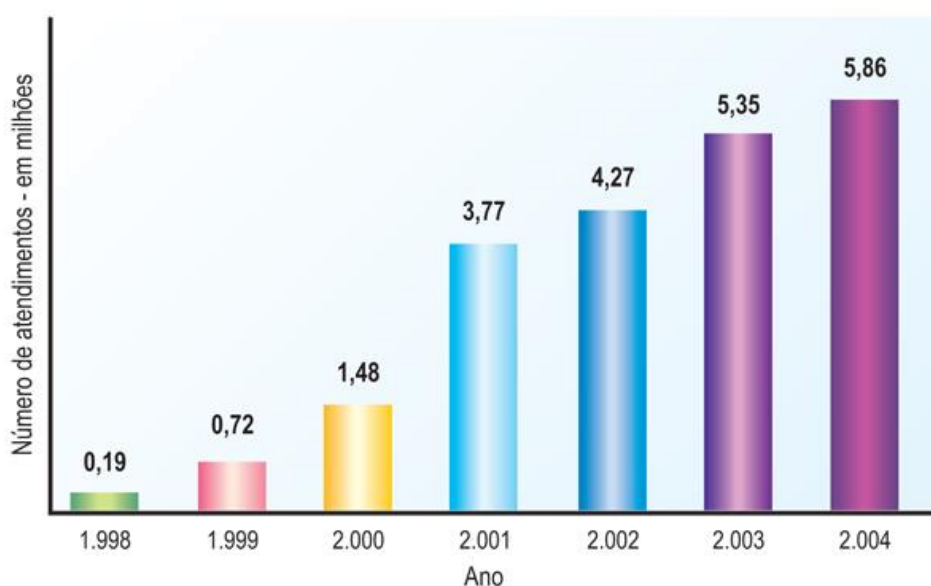


Figura 2: Evolução dos atendimentos do SUS no período de 1998 – 2004. Fonte: WHO, 2011.

Mundialmente, os custos diretos para o atendimento ao DM variam de 2,5% a 15% dos gastos nacionais em saúde, dependendo da prevalência local e da complexidade do tratamento disponível. Além dos custos financeiros, o DM acarreta também outros custos associados a dor, ansiedade, inconveniência e menor qualidade de vida que afeta doentes e suas famílias. Além disso, o DM representa também carga adicional à sociedade, em decorrência da perda de produtividade no trabalho, aposentadoria precoce e mortalidade prematura (Cadernos de Atenção Básica, 2006).

1.2 Diabetes mellitus

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o DM é uma doença metabólica caracterizada pelo aumento significativo de glicose circulante no sangue, resultante de anormalidades na secreção e/ou ação da insulina, tendo como consequência os distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. O DM é uma síndrome que além de hiperglicemia está associada com hiperlipidemia, estresse oxidativo, poliúria, polifagia, polidipsia, cetose, nefropatia e problemas cardiovasculares.

O DM pode ser dividido em dois tipos (1 e 2) mais comuns. O DM tipo 1, representa 10% do total de diabéticos e resulta da destruição autoimune das células beta pancreáticas, além da predisposição genética. O DM tipo 2 (não insulino dependente) é caracterizado por problemas na produção, secreção ou ação da insulina (American Diabetes Association, 2006; Cline, Petersen *et al.*, 1999; Szkudelski e Szkudelska, 2011). O DM tipo 2 se desenvolve lentamente e pode ser detectado após muitos anos, sendo acompanhado geralmente por resistência à insulina. Inicialmente, a glicemia é mantida a nível fisiológico devido ao aumento compensatório na secreção de insulina e este efeito pode atrasar o diagnóstico. Além disso, a superestimulação das células beta pode levar à secreção insuficiente de insulina ao longo do tempo. O DM tipo 2 é geralmente acompanhada de resistência à insulina, definida como diminuição da ação da insulina nas células alvo, principalmente adipócitos, hepatócitos e células musculares. A resistência à insulina desenvolve principalmente em indivíduos com sobrepeso ou obesos com diabetes Tipo 2 (Kahn e Flier, 2000).

O diabetes gestacional é caracterizado pela hiperglicemia com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. Os sintomas do diabetes gestacional são semelhantes ao DM tipo 2, mas é mais frequentemente diagnosticado por meio de exames pré-natal, ao invés de sintomas relatados (WHO, 2011).

Outro caso de diabetes é referente a tolerância diminuída à glicose (IGT) e a glicemia de jejum alterada (IFG) que são condições intermediárias na transição entre a normalidade e o diabetes. As pessoas com IGT ou IFG estão em alto risco de progressão para a DM tipo 2, embora isto não seja inevitável (WHO, 2011).

1.3 Fisiopatologia do diabetes e suas complicações

A porção endócrina do pâncreas é composta por agregados celulares denominados ilhotas de Langerhans distribuídos no parênquima pancreático em um número que varia de 300 mil a 1,5 milhão, compostos por quatro tipos celulares (Argenton, Zecchin *et al.*, 1999; Yamaoka e Itakura, 1999; Robertson e Harmon, 2006):

- células alfa, produtoras de glucagon (15-20% do total);
- células beta, produtoras de insulina (70-80%);
- células delta, produtoras de somatostatina (5%);
- Células PP, produtoras de peptídeo pancreático (1%).

A expressão do gene da insulina é restrita às células beta pancreáticas, o que confere a esse tipo celular o controle total sobre o único hormônio hipoglicemiante existente (Orci, 1985). A glicose é o principal estimulador da secreção de insulina. Sua entrada na célula beta é garantida por um transportador de alta capacidade e baixa afinidade denominado GLUT2. Após sua entrada, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato pela ação da enzima glicoquinase (hexoquinase IV), sendo a seguir direcionada a glicólise, etapa que consome 90% da glicose transportada ao interior da célula beta e responsável pela geração de piruvato (Malaisse, 1992). O piruvato é direcionado a mitocôndria, transformado em acetil coenzima A (acetil-CoA) e metabolizado pelo ciclo do ácido cítrico para produção de ATP. Com o aumento da relação ATP/ADP no meio intracelular, ocorre o fechamento de canais de K^+ - ATP dependentes o que leva à despolarização da membrana. A abertura dos canais de Ca^{2+} - voltagem dependente permite influxo de íons Ca^{2+} para a célula beta, que leva a ativação de um complexo sistema efetor, cujo resultado é a secreção de insulina (Malaisse, 1992). Além da glicose, poucos nutrientes (leucina, glutamina, alanina, arginina, frutose e alguns ácidos graxos) podem induzir de forma independente ou de forma potencializadora (do efeito primário da glicose) a secreção de insulina (Gylfe, 1988). É importante ressaltar que alguns medicamentos em uso clínico modulam a secreção de insulina por atuarem em etapas fundamentais do processo secretório. As sulfonilureias e as biguanidas, por exemplo, se ligam a uma proteína componente dos canais de K^+ - ATP dependentes, chamada SUR1. Tal interação promove o fechamento desses canais, despolarizando a célula beta

e induzindo a abertura de canais de Ca^{2+} - voltagens dependentes (Associação Brasileira de Diabetes, 2011).

1.4 Diabetes experimental induzido por estreptozotocina (STZ)

A fim de elucidar os mecanismos da patologia, cientistas têm usado diversas formas de se obter um modelo experimental, por exemplo, através de infecção viral, administração de dietas e agentes químicos, como o aloxano e estreptozotocina (STZ) ou por meio de animais geneticamente modificados (Cardenas, 2005).

A STZ (Figura 3), uma nitrosureia isolada, derivada do *Streptomyces achromogenes*, que possui efeito tóxico para as células beta pancreáticas (Rakieten, Rakieten *et al.*, 1963). Após a administração da STZ, ocorre destruição das membranas celulares e indução na quebra do DNA, levando à ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintase e à depleção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) (Yamamoto, Uchigata *et al.*, 1981). Esta enzima está localizada no núcleo das células beta do pâncreas e necessita de NAD^+ para realizar o reparo do DNA nuclear. Um aumento na sua atividade pode levar à depleção do NAD^+ intracelular. Os fenômenos citados anteriormente podem ser prevenidos através da administração de nicotinamida e picolinamida, pois são substâncias que inibem a ação da poli (ADP-ribose) sintase, mantendo assim uma homeostase nos níveis de NAD intracelular e na produção de insulina (Uchigata, Yamamoto *et al.*, 1983).

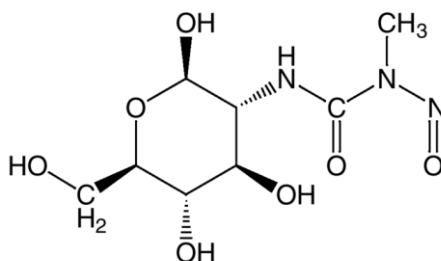


Figura 3: Estrutura da estreptozotocina. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Streptozotocin_Structure_NTP.png. Acesso em: 18 de julho de 2012.

A liberação de óxido nítrico, o aumento da glicação das proteínas do pâncreas e o aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio têm sido

propostos como possíveis causas da destruição das células pancreáticas propiciadas pela STZ (Kroncke, Fehsel *et al.*, 1995; O'brien, Harmon *et al.*, 1996). Além disso, foi demonstrado que a STZ esgota a quantidade de antioxidantes nas células-alvo, tornando-as mais suscetíveis ao dano oxidativo (Low, Nickander *et al.*, 1997). Sendo assim, um modelo ideal para o estudo de antioxidantes.

1.5 Formação de espécies reativas de oxigênio

O oxigênio existente na atmosfera é um dos responsáveis pelo fornecimento de energia para as células do nosso organismo, pois mantém as funções bioquímicas intra e intercelulares. Entretanto, através deste metabolismo aeróbico há maior chance de formar as espécies reativas do oxigênio (EROS) e, consequentemente, o estresse oxidativo (Halliwell, 1999).

Os radicais livres podem ser definidos como átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicas ou moleculares (Halliwell, 1999). Estes elétrons desemparelhados normalmente fornecem um considerável grau de reatividade a molécula ou átomo. Radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de espécies geradas por radicais em sistemas biológicos (Miller, Buettner *et al.*, 1990).

A redução de O_2 a duas moléculas de H_2O requer quatro elétrons. Se esta redução ocorresse por transferência de pares de elétrons, somente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seria formado. No entanto, o O_2 é reduzido por vias univalentes resultando em EROS intermediárias (Figura 4), tais como radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxil ($OH^{\cdot}$). O radical $OH^{\cdot}$ também pode ser formado pela interação de O_2 e H_2O_2 na presença de íons metálicos. Ambos radicais $O_2^{\cdot-}$ e $OH^{\cdot}$ são extremamente reativos e podem causar danos moleculares levando à morte celular.

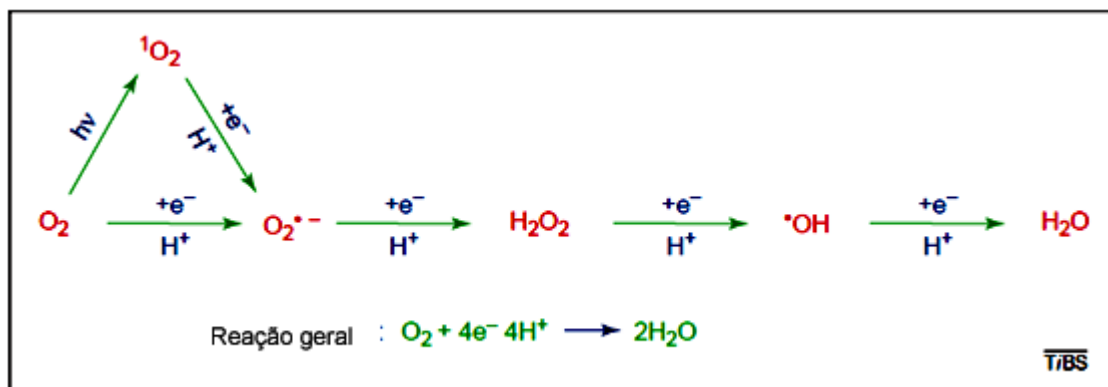


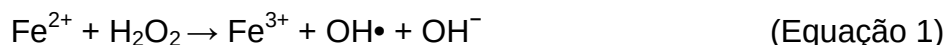
Figura 4: Vias de redução do oxigênio em água levando à formação de várias espécies reativas de oxigênio intermediárias. Adaptado de: Scandalios, 2002.

As causas das propriedades tóxicas do oxigênio eram obscuras até a publicação de Gershman (1954) sobre a teoria do radical livre e da toxicidade do oxigênio, afirmando que a toxicidade do oxigênio está relacionada às suas formas reduzidas. A formação de EROS nos sistemas biológicos está bem estabelecida, pois é observada a geração destas espécies em diversos locais, como na mitocôndria, lisossomos, peroxissomos, membrana plasmática e nuclear, retículo endoplasmático, bem como no citosol.

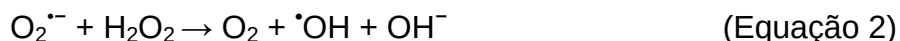
O H_2O_2 pode ser produzido por duas fontes básicas: indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida pela dismutação do $O_2^{\bullet -}$ ou, diretamente, pela redução divalente do oxigênio molecular. O processo indireto é catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) e o processo direto é realizado pelas oxidases, como a D-aminoácido oxidase, a xantina oxidase, uricase, a alfa-hidroxiácido oxidase e a glicolato oxidase (Del Maestro, 1980).

A geração mitocondrial de H_2O_2 é um evento fisiológico sob condições aeróbias e depende do estado metabólico em que a célula se encontra. O aumento da pressão parcial de oxigênio produz uma elevação proporcional na formação de H_2O_2 na mitocôndria (Boveris e Chance, 1973).

As reações que produzem $OH^\bullet$ são mais raras e necessitam da presença de metais de transição como o ferro e o cobre. A reação de H_2O_2 com os íons ferroso ou cuproso é chamada reação de Fenton (Equação 1 e 2), a qual gera um $OH^\bullet$ extremamente reativo.



O $\text{OH}\cdot$ também pode ser formado a partir da reação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com o H_2O_2 na presença de íons ferro ou cobre.



O ferro necessário para catalisar a reação de Fenton pode ser proveniente da ferritina, da hemoglobina ou da mioglobina (Werns e Lucchesi, 1990). Os radicais livres derivados da interação do H_2O_2 com a metamioglobina podem desencadear o processo de lipoperoxidação, e danificar a célula (Kanner e Harel, 1985).

Concentrações elevadas de EROS podem ser importantes mediadores de danos em estruturas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007). O radical $\text{OH}\cdot$ reage com a molécula de DNA, danificando tanto as bases purina como pirimidina, e também a ligações da desoxirribose (Halliwell, 1999). Estes causam modificações permanentes no DNA que representam os primeiros passos envolvidos na mutagênese, carcinogênese e envelhecimento.

A lipoperoxidação (LPO) (Figura 5) pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais alquil ($\text{L}\cdot$), a alcóxil ($\text{LO}\cdot$) e peróxil ($\text{LOO}\cdot$), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (Benzie, 1996). A LPO talvez se constitua no evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam à transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (Barber e Bernheim, 1967; Vaca, Wilhelm *et al.*, 1988).

Basicamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos, a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática envolvendo as ciclooxygenases

e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos poliinsaturados e a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de EROS, espécies reativas de nitrogênio, metais de transição e outros radicais livres (Porter, 1984; Al-Mehdi, Dodia *et al.*, 1993).

O início da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados requer um oxigênio na forma ativada. O processo da LPO pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo de cadeia poliinsaturada sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH₂-), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (Halliwell, 1999). Em meio aeróbico, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical LOO•, o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical LOO• com o átomo de hidrogênio abstraído gera um LOOH. Peróxidos cíclicos também podem ser formados, quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a LPO (Halliwell, 1999).

Sistemas enzimáticos também podem iniciar a oxidação dos ácidos graxos de cadeia poliinsaturada. As principais enzimas envolvidas neste processo são as peroxidases e dioxigenases. As peroxidases são enzimas inespecíficas que catalisam a oxidação de muitos substratos, incluindo ácidos graxos. Peróxidos e hidroperóxidos reagem com o ferro contido no sítio catalítico das peroxidases, gerando um composto intermediário, que oxida um doador de hidrogênio, por exemplo, o NADPH. Este segundo composto formado, pode oxidar o substrato e regenerar a enzima (Chance, Sies *et al.*, 1979).

As lipoxigenases estão presentes no citossol e na fração microssomal das células e catalisam a inserção do oxigênio nos ácidos graxos de cadeia poliinsaturada, produzindo um LOOH. Existem pelo menos três formas interconvertíveis da enzima. A lipoxigenase no estado ferroso passa à forma ativa, no estado férrico, na presença de traços de hidroperóxido. Na forma ativa, a enzima abstrai um hidrogênio do ácido graxo, resultando o radical alquil do ácido

graxo e a enzima volta ao estado ferroso. O oxigênio é introduzido ao substrato formando um LOO•. As lipoxigenases têm maior capacidade de reagir com ácidos graxos dioxigenados possuindo uma estrutura 1,4-cis,cis-pentadieno, como por exemplo, os ácidos linoleico, alfa-linolênico, glinolênico, araquidônico, eicosapentaenoico e docosaexaenoico (Chance, Sies *et al.*, 1979; Hsieh e Kinsella, 1989) .

Além das lipoxigenases, os tecidos animais contêm ciclooxigenases, enzimas que formam prostaglandinas pela introdução de oxigênio na molécula do ácido araquidônico. Portanto, ciclooxigenases catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina, que é um endoperóxido cíclico (PGG₂), por série de reações nas quais o O₂ é inserido ao ácido graxo, seguindo-se ativação do ácido graxo via abstração do hidrogênio. As ciclooxigenases, em condições fisiológicas, são as maiores produtoras de peróxidos lipídicos (Chance, Sies *et al.*, 1979; Hsieh e Kinsella, 1989).

Os mecanismos envolvidos na oxidação de proteínas por EROS foram elucidados por estudos de exposição dos aminoácidos, peptídeos simples e proteínas às radiações ionizantes sob condições em que foram formados os radicais hidroxil, ou uma mistura de radicais hidroxil ou superóxido (Stadtman, 2004). As cadeias laterais de todos os resíduos de aminoácidos de proteínas, em particular cisteína e metionina, são susceptíveis à oxidação pela ação de EROS (Stadtman, 2004). A oxidação dos resíduos de cisteína pode levar à formação reversível de dissulfetos entre os grupos tiol (-SH).

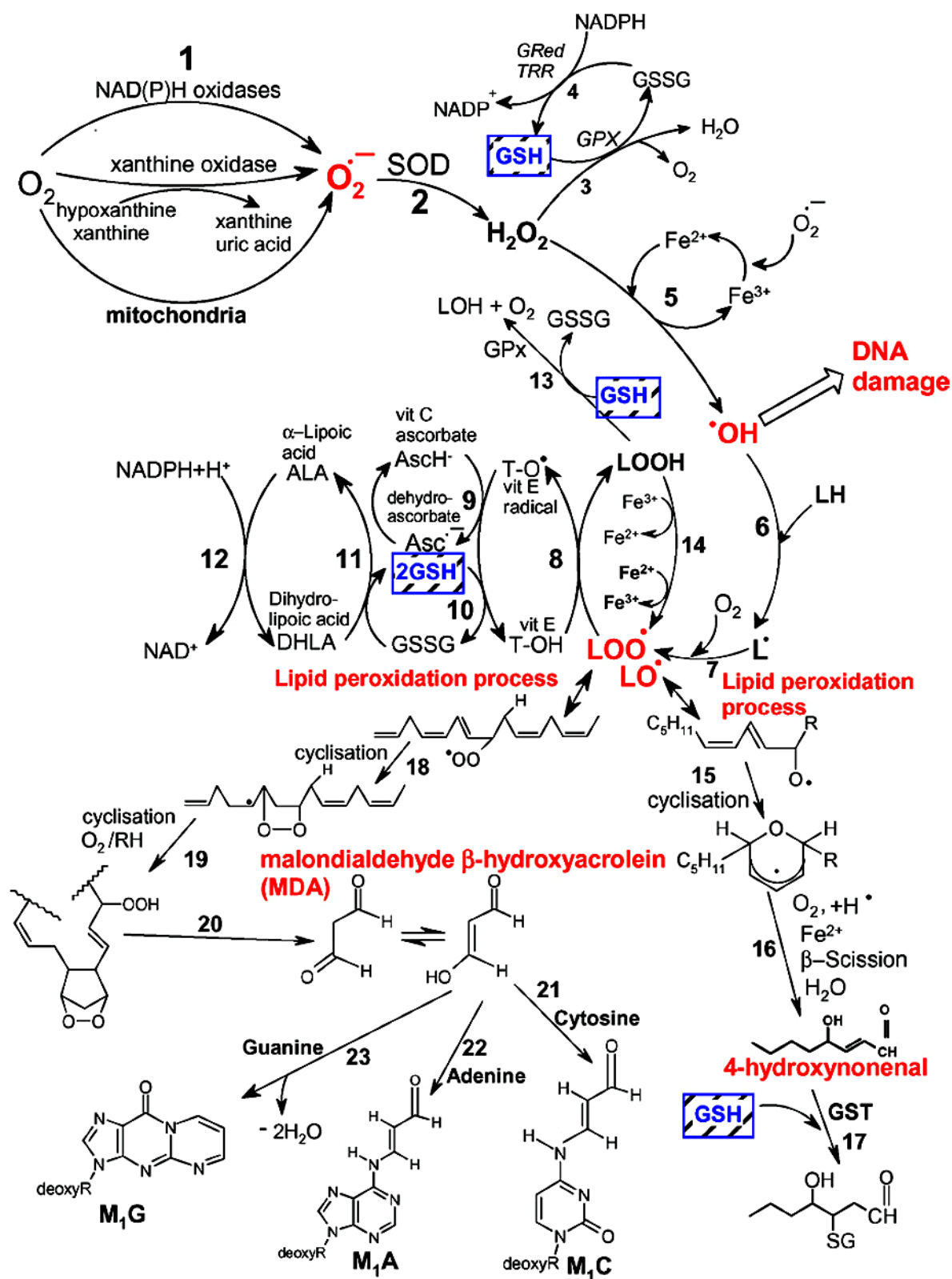


Figura 5: Vias de formação de ROS, o processo de peroxidação lipídica, o papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C e ácido lipóico) durante o estresse oxidativo.

Figura 5: Vias de formação de ROS, o processo de peroxidação lipídica, o papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C e ácido lipóico) durante o estresse oxidativo. **Reação 1:** o radical ânion superóxido é formado pelo processo de redução do oxigênio molecular mediado por NAD (P)H oxidase ou xantina oxidase ou não enzimaticamente por compostos reativos-redox, tais como a semi-ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons. **Reação 2:** o radical ânion superóxido é dismutado pela superóxido dismutase (SOD) em peróxido de hidrogênio. **Reação 3:** o peróxido de hidrogênio é mais eficientemente eliminado pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) que requer (glutathiona reduzida) GSH como doador de elétrons. **Reação 4:** a glutathiona oxidada (GSSH) é reduzida à GSH pela glutathiona redutase (GR) que utiliza NADPH como doador de elétrons. **Reação 5:** alguns metais de transição (por exemplo, Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem quebrar o peróxido de hidrogênio em radical hidroxil (Reação de Fenton). **Reação 6:** o radical hidroxil pode abstrair um elétron a partir do ácido graxo poliinsaturado (LH) para dar origem a um radical alquil ($\text{L}^\bullet$). **Reação 7:** o radical lipídeo pode interagir com o oxigênio molecular para formar um radical peroxil ($\text{LOO}^\bullet$). Se o radical peroxil não é reduzido por antioxidantes, ocorre o processo de peroxidação lipídica (reações 18-23 e 15-17). **Reação 8:** o radical peroxil é reduzido no interior da membrana por uma forma reduzida da vitamina E (T-OH), resultando na formação de um hidroperóxido lipídico e um radical de vitamina E ($\text{TO}^\bullet$). **Reação 9:** a regeneração da vitamina E pela vitamina C: o radical vitamina E ($\text{TO}^\bullet$) é reduzido de volta para vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico. **Reação 10:** a regeneração da vitamina E por GSH: o radical vitamina E ($\text{TO}^\bullet$) oxidado é reduzido pela GSH. **Reação 13:** hidroperóxidos lipídicos são reduzidos à álcoois e dioxigênio pela GPx usando GSH como doador de elétrons. Adaptado de: Valko, Leibfritz, *et al.*, 2007.

1.6 Defesas antioxidantes

O organismo possui sistemas de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático que incluem as moléculas que estabilizam as espécies reativas do oxigênio, ácido úrico, ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E); moléculas que contêm sulfidril, glutathiona, carotenoides, flavonoides e enzimas antioxidantes, como o SOD, a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (Frei, Stocker *et al.*, 1988; Stinefelt, Leonard *et al.*, 2005). Este balanço é essencial para a sobrevivência do organismo e sua saúde (Valko, Leibfritz *et al.*, 2007).

Considerando que o estresse oxidativo desempenha um importante papel nas complicações do DM, a terapia antioxidante tem atraído a atenção de pesquisadores. Além dos estudos com antioxidantes tradicionais, como vitamina C, vitamina E e superóxidos miméticos, outras moléculas com ação antioxidante

têm sido investigadas. Vários estudos demonstram o papel de macronutrientes na prevenção do DM (Marshall, Hoag *et al.*, 1994; Meyer, Kushi *et al.*, 2000; Van Dam, Willett *et al.*, 2002; Liu, Serdula *et al.*, 2004), mas, por outro lado, existem poucas evidências do papel das vitaminas e minerais na prevenção primária e secundária desta doença.

Como o diabetes está associado com o aumento do estresse oxidativo (Wen, Skidmore *et al.*, 2002; Ceriello e Motz, 2004), este fato reforça o interesse no uso de compostos antioxidantes como uma tentativa de prevenir as complicações a longo prazo. No que diz respeito à prevenção do DM e a modificação na dieta, os relatos atuais ainda não permitem que qualquer recomendação segura e específica seja feita em relação ao uso de suplementos. Dado que o DM é uma condição de estresse oxidativo aumentado, a terapia antioxidante poderia representar um potencial coadjuvante no tratamento farmacológico antidiabético.

No tecido pancreático, as células beta são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, pois elas apresentam baixa expressão e baixa atividade de enzimas antioxidantes (Grankvist, Marklund *et al.*, 1981). Por isso, são necessários estudos avaliando substâncias com potencial antioxidante no tecido pancreático para proteção deste tecido em portadores de DM. Apesar de dados mostrarem a eficácia de produtos naturais em modelos experimentais sobre o tecido pancreático, ainda são necessários estudos mais consistentes sobre os seus efeitos benéficos para efetivação do uso (Afolayan e Sunmonu, ; Cumaoglu, Ozansoy *et al.*, ; Dahech, Belghith *et al.*, ; Erejuwa, Sulaiman *et al.*, ; Sefi, Fetoui *et al.*, ; Yazdanparast, Ardestani *et al.*, 2007; Ardestani, Yazdanparast *et al.*, 2008).

1.6.1 Antioxidantes enzimáticos

As enzimas antioxidantes têm como principal função eliminar as EROS (Figura 6) e corrigir pequenos desvios nas concentrações fisiológicas destas moléculas. As alterações na atividade destas enzimas podem ser consideradas como biomarcadores da resposta antioxidante (Sies, 1993).

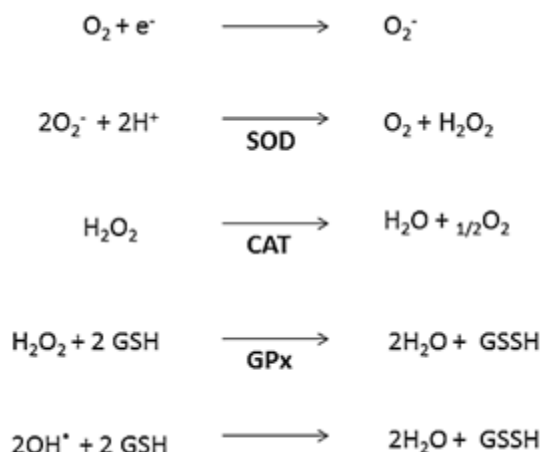


Figura 6: Sistema de defesa antioxidante-enzimático. O superóxido dismutase (SOD) dismuta o ânion superóxido ($2\text{O}_2^{\cdot -}$) em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é decomposto pela catalase (CAT) em água. A glutathione peroxidase (GPx) elimina o H_2O_2 na presença de glutathione reduzida (GSH) .

Os processos de formação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio estão correlacionados, pois o $\text{O}_2^{\cdot -}$ é convertido em H_2O_2 por uma reação catalisada pela SOD. Esta enzima possui várias isoformas, diferindo-se quanto à natureza do centro metálico ativo, por sua constituição em aminoácidos, pelo número de subunidades, pelos seus cofatores e outras características. Uma delas contém cobre e zinco (CuZn-SOD) em seu sítio de ativação e é encontrada no citosol das células eucarióticas, lisossomos, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (Vasconcelos, Goulart *et al.*, 2007). Sua atividade enzimática foi descoberta por Mccord e Fridovich (1969). Dentro da mitocôndria, a SOD está presente ligada ao manganês (Mn-SOD), estando localizada na matriz mitocondrial.

Os efeitos citotóxicos do H_2O_2 são limitados por sua degradação pela CAT. Esta enzima, por sua vez, exerce a função de decompor o H_2O_2 em água e oxigênio, existindo sob duas isoformas: selênio-independente e selênio-dependente (Mates, Perez-Gomez *et al.*, 1999), que diferem-se quanto ao número de subunidades, a natureza ligante do selênio no centro ativo e quanto aos seus mecanismos catalíticos. O mecanismo catalítico da CAT e a sua velocidade de reação muito alta dificultam a sua saturação pelo seu substrato, o H_2O_2 . A CAT encontra-se, principalmente nos peroxissomos, de onde remove o H_2O_2 gerado pela beta-oxidação dos ácidos graxos ou pela oxidação dos alcanos. Também

está presente nos eritrócitos e em menor quantidade no plasma. A sua elevada atividade catalítica é a responsável pela regulação dos níveis intracelulares de H_2O_2 .

O substrato para a reação catalítica da GPx é o H_2O_2 ou o peróxido orgânico, que são decompostos em água ou álcool. A GPx apresenta-se sob 4 formas: GPx1 ou clássica, encontrada no citosol de todas as células do corpo; GPx2 ou gastrointestinal, específica do trato gastrointestinal; GPx3 ou plasmática ou extracelular, encontrada no fluido do revestimento interno do pulmão e no leite materno, além do plasma em mamíferos; e a GPx4, que atua sobre peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e lipoproteínas, reduzindo o hidroperóxido da timina, formado como consequência do ataque dos radicais à base timina do DNA (Rayman, 2000; Czuczejko, Zachara *et al.*, 2003). A GPx compete com a CAT pelo H_2O_2 como substrato e é a principal fonte de proteção contra as EROS (Valko, Rhodes *et al.*, 2006). A família de GPx integra o grupo de selenoproteínas que têm em seu sítio ativo o selênio, obtido da dieta ligado à metionina, em alimentos de origem vegetal (selenocisteína). O selênio é reconhecidamente um nutriente antioxidante, com recomendações de obtenção na dieta considerando sua atividade antioxidante e nutricional (Amaya-Farfan, Domene *et al.*, 2001; Burk e Levander, 2002).

1.6.2 Antioxidantes não-enzimáticos

O sistema de defesa não-enzimático é formado por antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. Os antioxidantes hidrossolúveis são compostos que têm alta afinidade pela água, como a glutathiona (GSH), o ácido úrico e o ácido ascórbico. Os antioxidantes lipossolúveis são compostos que têm alta afinidade por lipídios, como os carotenoides, o alfa-tocoferol e a bilirrubina (Murphy e Sies, 1991).

1.7 Diabetes e o estresse oxidativo

O aumento na glicose circulante caracteriza a um quadro de hiperglicemia crônica desencadeando alterações no metabolismo de carboidratos (Acheson),

lipídeos e proteínas (Alberti e Zimmet, 1998), ocasionando distúrbios no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor da formação de danos, denominado estresse oxidativo (Halliwell, 1999).

Consideráveis evidências existem postulando que o dano oxidativo no DM está aumentado (West, 2000) e uma das teorias é que o aumento da concentração de açúcares causaria a glicosilação de macromoléculas, que levaria a uma modificação não-enzimática, diminuindo a função biológica. Nesse processo são gerados radicais livres que agem por todo o organismo promovendo o dano oxidativo (Rellier, Ruggiero-Lopez *et al.*, 1999). Os relatos relacionando o estado diabético e a atividade de enzimas antioxidantes apresentam resultados diversos em tecidos diferentes.

Esse quadro de desequilíbrio pode induzir ao estresse oxidativo por vários mecanismos, tais como a glicose oxidada, a formação avançada de produtos finais de glicação e ativação da via poliol, gerando EROS. Além disso, o aumento da produção de EROS pelas mitocôndrias em condições hiperglicêmicas é reconhecido como uma das principais causas de complicações clínicas associadas ao DM e a obesidade, resultando em um aumento da morbidade e mortalidade ao indivíduo diabético (Morales, Garcia-Salcedo *et al.*, ; Khalil, Pepato *et al.*, 2008).

A hiperglicemia induzida aumenta a transferência de doadores de elétrons (NADH e FADH₂) e aumenta o fluxo de elétrons através da membrana interna da cadeia transportadora de elétrons (Figura 7). Este excesso gera um elevado gradiente de prótons em toda a membrana mitocondrial, eventualmente, inibindo a transferência de elétrons a partir da coenzima Q (CoQ) para o complexo III. Assim, estes elétrons são liberados dentro da mitocôndria e usados para gerar radicais superóxido a partir de moléculas de oxigênio (Brownlee, 2001). As mitocôndrias são a principal fonte de EROS na célula resultante do transporte de elétrons imperfeitamente acoplado (Erol, 2007). Quando a ingestão calórica excede o gasto energético, o aumento induzido de substrato no ciclo do ácido cítrico gera um excesso de NADH e EROS mitocondrial mudando o ambiente redox da célula.

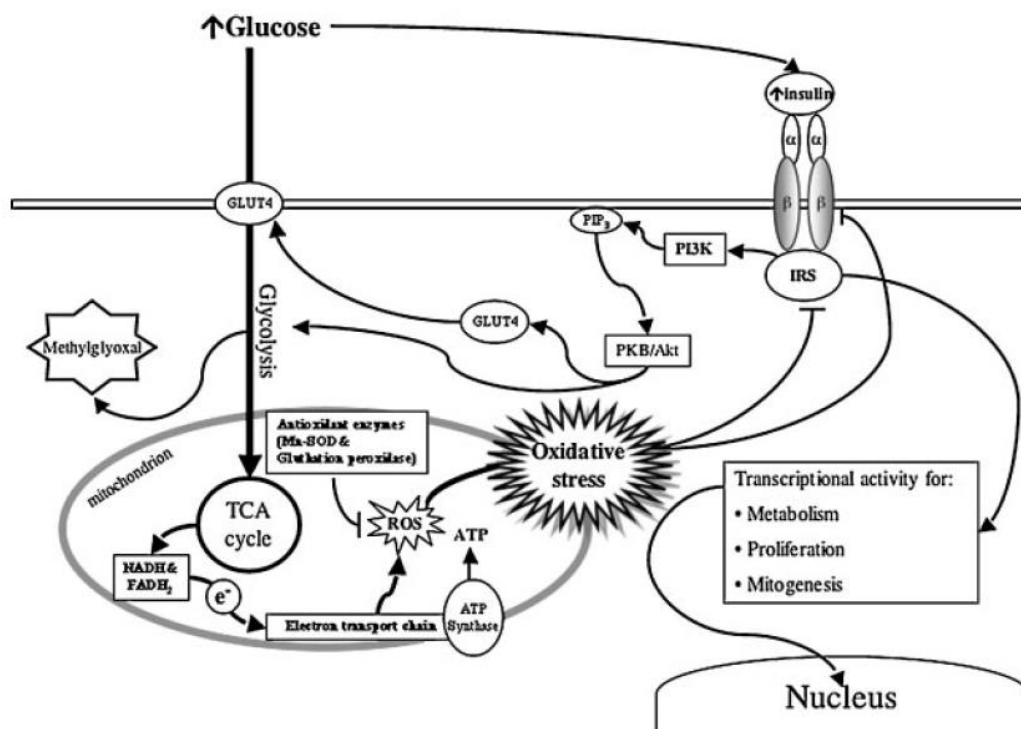


Figura 7: Metabolismo de glicose leva a um aumento de NAD e FADH₂. O transporte de elétrons gera ânions superóxido. O estresse oxidativo é resultado de um desbalanço entre a produção de EROS e as defesas antioxidantes. O aumento de glicose estimula a produção de insulina, aumentando a captação de glicose na célula iniciando um ciclo vicioso. Adaptado de Erol, 2007.

O ambiente redox desempenha um papel crítico na função celular normal da célula, incluindo regulação da proliferação e diferenciação, bem como nos processos apoptóticos (Rolo e Palmeira, 2006). Além disso, a superprodução de superóxido induzida por hiperglicemia inibe significativamente a glicose-6-fosfato desidrogenase, o nível de enzima limitante da via das pentoses fosfato é muito importante para a defesa antioxidante. O produto NADPH, é o principal redutor da célula e é necessário para fornecer equivalentes redutores para o sistema glutathione peroxidase/redutase (Rolo e Palmeira, 2006).

Além de ter um papel chave na produção de EROS, a hiperglicemia também induz hiperinsulinemia, aumentando o nível de estresse oxidativo. Na ausência de uma resposta compensatória a partir da rede antioxidante, o sistema fica sobrecarregado e leva a ativação de vias de sinalização sensíveis ao estresse intracelular (Evans, Goldfine *et al.*, 2002). Em geral, EROS pode afetar a cascata de sinalização da insulina e a atividade metabólica insulino-dependente de modo

bimodal, dependendo da dose e tempo de curso. Curto tempo de exposição às concentrações milimolares de EROS resultam em efeito insulinoimético. A exposição crônica ao estresse oxidativo, entretanto, inibe as vias metabólicas induzidas pela insulina (Bloch-Damti e Bashan, 2005). A produção de EROS diminui quando a fonte de elétrons é diminuída na cadeia respiratória. Portanto, qualquer redução no fluxo de glicose e ácidos graxos leva a diminuição da produção de equivalentes redutores o que pode diminuir a produção de EROS e proteger a célula contra danos oxidativos (Fridlyand e Philipson, 2006).

Na literatura, os estudos com animais diabético induzidos por estreptozotocina e as defesas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no tecido pancreático mostram resultados divergentes. Estudos mostram que a atividade das enzimas SOD e CAT está elevada em ratos diabéticos (Wohaieb e Godin, 1987; Godin, Wohaiieb *et al.*, 1988; Kakkar, Kalra *et al.*, 1995) e não há alteração na atividade da enzima GPx e/ou na concentração de GSH quando comparadas aos animais do grupo controle. A divergência de resultados pode ser devido ao tempo de indução que influencia a atividade das diversas enzimas do sistema antioxidante (Oberley, 1988).

1.8 Tratamento do diabetes

Na medicina moderna não há disponível uma forma de tratamento eficaz para a cura do DM (Ghosh e Suryawanshi, 2001). As terapias disponíveis para tratamento do DM incluem insulina e vários agentes orais, como sulfonilureias, metformina, inibidores de alfa-glicosidases (acarbose e voglibose) e troglitazona. Essas drogas são usadas como monoterapia ou em combinação para o controle da glicemia (Kameswara Rao, Renuka Sudarshan *et al.*, 2003).

A acarbose é um inibidor competitivo de alfa-glicosidases intestinais que retarda a quebra de sacarose e de amido, assim como a absorção de glicose e frutose. Além dos efeitos antihiperglicemiantes, a acarbose também altera o perfil hipertrigliceridêmico e hipercolesterolêmico característico do diabetes.

Os inibidores de alfa-glicosidase e alfa-amilase que são inibidores da absorção de carboidratos, pois retardam a absorção dos carboidratos e conseqüentemente a entrada da glicose na circulação, sendo por isso

considerados antihiperglicemiantes (Goodman & Gilman, 2003). Estudos *in vitro* demonstram que diferentes plantas, especialmente as tradicionalmente usadas em terapia comum de DM na África ou Europa, são capazes de inibir a alfa-amilase, é responsável pela quebra dos oligossacarídeos em monossacarídeos, os quais são absorvidos. Por exemplo, uma inibição da atividade da alfa-amilase da ordem de 90% foi observada com o extrato das folhas de *Tamarindus indica* (Funke e Melzig, 2006).

Embora drogas como sulfonilureias e biguanidas sejam utilizadas para o tratamento de DM, elas apresentam efeitos indesejáveis ou contraindicações (Barger et al, 1985; Rang, 1991). As sulfonilureias e meglitinidas são secretagogos de insulina, ou seja, estimulam a secreção de insulina tendo ação hipoglicemiante. As biguanidas e tiazolinedionas, que são sensibilizadores de insulina, aumentam a utilização de glicose no músculo esquelético e adipócitos e diminuem a produção hepática de glicose, atuando assim como antihiperglicemiantes.

O tratamento com insulina proporciona controle glicêmico eficaz, mas tem como desvantagem a ineficácia por via oral, meia-vida curta, resistência à insulina (Piedrola, Novo et al., 2001), anorexia nervosa, atrofia cerebral, esteatose (Yaryura-Tobias, Pinto et al., 2001), e em dose excessiva pode resultar em hipoglicemia fatal, o que limita sua utilização (Maiti, Das et al., 2005). Neste contexto, um composto que reduz a glicemia sem causar efeitos colaterais, mesmo se administrado por longo período de tempo, seria usado para ambos os tipos de DM.

Antes do advento da insulina exógena e hipoglicemiantes orais, o uso de plantas medicinais era a principal forma de controle do diabetes, pois são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas (Gray e Flatt, 1999). Alguns de seus princípios ativos 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. Dentre os compostos ativos antidiabéticos têm-se destacado polissacarídeos, proteínas, esteroides, terpenoides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos, triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (Abdel-Hassan et al., 2000). Desta forma, a medicina tradicional e complementar tem sido

procurada para o tratamento de diferentes doenças (Geetha et al. 1994; Rao et al. 2003). Apesar de vários estudos na literatura com plantas antidiabéticas usadas na medicina popular, não há nenhuma publicação científica sobre *Vochysia rufa* Mart. que foque o efeito antidiabético.

1.9 *Vochysia rufa* Mart

A família Vochysiaceae abrange seis gêneros e cerca de 200 espécies, neotropicais, com poucos representantes em regiões subtropicais. O único gênero não americano é *Erismadelphus*, que ocorre na África tropical ocidental. Os cinco gêneros americanos estão bem representados na flora brasileira, tendo seus centros de diversidade situados nas regiões Guiano-Amazônica, Planalto Central brasileiro e na Floresta Atlântica.



Figura 8: *Vochysia rufa* Mart. Foto retirada em Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil.

O gênero *Vochysia* compreende cerca de 100 espécies, características por serem grandes árvores e arbustos que ocorrem ao longo da América Tropical do México ao Peru. Várias destas espécies são utilizadas por comunidades tradicionais indígenas na América do Sul para uma variedade de terapêuticos relacionados à inflamação (Schultes e Raffauf, 1990), devido à presença do ácido betulínico, encontrado em diversas espécies de *Vochysia* (Weniger, Lobstein et al., 2005). Espécies desse gênero são usadas também no tratamento de feridas

da pele e para aliviar doenças respiratórias, como asma e congestão pulmonar (Schultes e Raffauf, 1990). Além disso, o extrato metanólico de folhas de *Vochysia tucanorum* demonstrou atividade antiulcerogênica gástrica devido à presença de triterpenos pentacíclicos como o ácido betulínico, ácido betulínico epi, eritrodiol e misturas de derivados ursólicos e oleanólicos (Gomes Rde, Bonamin *et al.*, 2009).

Trabalhos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Vochysia* levaram ao isolamento de polifenóis e triterpenos (Zucaro, Compagnonea *et al.*, 2000). O extrato da casca de *V. rufa* contém compostos fenólicos, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, saponinas e triterpenóides (Silva, 2009). Além disso, o ácido betulínico, um tipo de lupano-triterpeno com citotoxicidade seletiva em diferentes linhagens de células tumorais é capaz de inibir PDE4, um alvo potencial para a inibição do crescimento tumoral (Huang, Ducharme *et al.*, 2001; Zuco, Supino *et al.*, 2002). A atividade antibacteriana do ácido sericico, o principal constituinte ativo isolado da casca de *Vochysia divergens*, também pode explicar e justificar, pelo menos em parte, o uso popular destas plantas no tratamento de doenças infecciosas (Hess, Brum *et al.*, 1995). Contudo, em estudo realizado com moradores da cidade de Alto Paraíso de Goiás/GO, a planta conhecida como “quina doce” (*V. rufa*) é utilizada no tratamento de resfriados e como vermífuga (Silva, 2009). Entretanto, não foi encontrado na literatura estudos comprovando a ação antidiabética e antioxidante desta espécie.

A justificativa para o estudo com *V. rufa* foi baseado no relato de experiência de um médico que atende pacientes com DM tipo 1 em uma Unidade de Saúde da Prefeitura de Uberlândia, Minas Gerais. Segundo Dr. Ricardo Rodrigues o paciente após tomar o macerado aquoso da casca de *V. rufa* reduziu em 50% o uso de insulina. O médico relatou que fez vários exames e a única explicação para a redução da utilização de insulina foi o uso do macerado aquoso de “quina-doce”. Além disso, varias pessoas com diabetes tipo 2 fazem uso desta planta, pois um senhor residente na cidade de Uberlândia/MG busca as cascas de quina doce em Abadia dos Dourados quinzenalmente.

Estudos para validação do conhecimento popular são necessários para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, algumas espécies podem causar efeitos tóxicos ou genotóxicos a longo prazo. Efeitos adversos como

intoxicação, bem como a interação (sinergismo ou antagonismo) com outras drogas de uso crônico ocorrem comumente (Veiga-Junior, Pinto, 2005). Desta forma, é função da Universidade orientar a população sobre o uso devido de plantas medicinais.

1.10 Faseolamina

Em 1975, Marshall e Lauda (1975) purificaram uma glicoproteína inibidora da alfa-amilase a partir da espécie de feijão *Phaseolus vulgaris*, denominado faseolamina. Alguns trabalhos isolaram e caracterizaram bioquimicamente o inibidor de amilase extraído de *P. vulgaris* (Marshall e Lauda, 1975; Le Berre-Anton, Bompard-Gilles *et al.*, 1997; Sawada, Takeda *et al.*, 2002; Tormo, Gil-Exojo *et al.*, 2004).

O inibidor de alfa-amilase extraído de *P. vulgaris* apresenta 3 isoformas: α AI-1, α AI-2 e α AIL (Obiro, Zhang *et al.*, 2008). α AI-1, a isoforma em maior concentração na semente, é uma glicoproteína tetrâmera com duas subunidades alfa de aproximadamente 11kDa e duas subunidades beta de aproximadamente 15kDa. Esse inibidor não é capaz de inibir alfa-amilases de plantas, fungos e bactérias, mas bloqueia a atividade de alfa-amilases de mamíferos e insetos (Marshall e Lauda, 1975). A atividade ótima desse inibidor ocorre a 37°C e em pH 5,5 (Le Berre-Anton, Bompard-Gilles *et al.*, 1997).

A faseolamina é comercializada como um concentrado proteico para redução de peso (Santimone, Koukiekolo *et al.*, 2004; Obiro, Zhang *et al.*, 2008). Estudos na literatura mostram a redução de peso e o efeito inibitório sobre a atividade da alfa-amilase por *P. vulgaris* (Pittler e Ernst, 2004; Obiro, Zhang *et al.*, 2008). No entanto, há controvérsias na literatura mostrando que extratos de *P. vulgaris* disponíveis no mercado não influenciam na digestão de carboidratos em seres humanos (Carlson, Li *et al.*, 1983; Montoya, Leterme *et al.*, 2008; Obiro, Zhang *et al.*, 2008). O potencial inibitório sobre a atividade da alfa-amilase é influenciado pelo modo de extração do produto.

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório, com três amostras de faseolaminas comercializadas em farmácias de manipulação, observamos que uma destas amostras inibiu cerca de 30% a atividade da alfa-amilase *in vitro* e

não foi visualizado perfil proteico em gel de poliacrilamida; enquanto que as demais inibiram 100%. Outra amostra testada em ratos diabéticos induzidos reduziu significativamente a glicemia e amenizou problemas renais e hepáticos causados pela hiperglicemia.

Apesar de controvérsias, estudos com inibidores de alfa amilase são necessários para demonstrar o potencial em reduzir os danos oxidativos causados pela hiperglicemia.

Referências¹

Acheson, K. J. Carbohydrate for weight and metabolic control: where do we stand? Nutrition, v.26, n.2, Feb, p.141-5.

Aebi, H., H. Suter, *et al.* Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. Biochem Genet, v.2, n.3, Nov, p.245-51. 1968.

Afolayan, A. J. e T. O. Sunmonu. *Artemisia afra* Jacq. ameliorates oxidative stress in the pancreas of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Biosci Biotechnol Biochem, v.75, n.11, p.2083-6. 2011.

Al-Mehdi, A. B., C. Dodia, *et al.* A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substance during lung ischemia-reperfusion. Biochim Biophys Acta, v.1167, n.1, Mar 17, p.56-62. 1993.

Alberti, K. G. e P. Z. Zimmet. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med, v.15, n.7, Jul, p.539-53. 1998.

Ali, H., P. J. Houghton, *et al.* alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. J Ethnopharmacol, v.107, n.3, Oct 11, p.449-55. 2006.

Almdal, T. P. e H. Vilstrup. Strict insulin therapy normalises organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. Diabetologia, v.31, n.2, Feb, p.114-8. 1988.

Amaya-Farfan, J., S. M. A. Domene, *et al.* DRI: Síntese Comentada das Novas Propostas sobre Recomendações Nutricionais para Antioxidantes. Rev.Nutr.Campinas, v.14, p.71-78. 2001.

¹ As referências deste capítulo foram formatadas conforme as normas da ABNT.

Ames, B. N., R. Cathcart, *et al.* Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.78, n.11, Nov, p.6858-62. 1981.

Ardestani, A., R. Yazdanparast, *et al.* Therapeutic effects of Teucrium polium extract on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. J Med Food, v.11, n.3, Sep, p.525-32. 2008.

Argenton, F., E. Zecchin, *et al.* Early appearance of pancreatic hormone-expressing cells in the zebrafish embryo. Mech Dev, v.87, n.1-2, Sep, p.217-21. 1999.

Barber, A. A. e F. Bernheim. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. Adv Gerontol Res, v.2, p.355-403. 1967.

Baynes, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes, v.40, n.4, Apr, p.405-12. 1991.

Bell, R. C., T. M. Sakanashi, *et al.* High fructose intake significantly reduces kidney copper concentrations in diabetic, islet transplanted rats. Biol Trace Elem Res, v.61, n.2, Feb, p.137-49. 1998.

Benzie, I. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. Int J Food Sci Nutr, v.47, n.3, May, p.233-61. 1996.

Benzie, I. F. e J. J. Strain. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods Enzymol, v.299, p.15-27. 1999.

Beutler, E., O. Duron, *et al.* Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med, v.61, May, p.882-8. 1963.

Bloch-Damti, A. e N. Bashan. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. Antioxid Redox Signal, v.7, n.11-12, Nov-Dec, p.1553-67. 2005.

Boveris, A. e B. Chance. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J, v.134, n.3, Jul, p.707-16. 1973.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Bray, T. M. e W. J. Bettger. The physiological role of zinc as an antioxidant. Free Radic Biol Med, v.8, n.3, p.281-91. 1990.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, v.414, n.6865, Dec 13, p.813-20. 2001.

Bunk, M. J., A. M. Dnistrian, *et al.* Dietary zinc deficiency decreases plasma concentrations of vitamin E. Proc Soc Exp Biol Med, v.190, n.4, Apr, p.379-84. 1989.

Burk, R. F. e O. A. Levander. In: M. E. Shils, J. A. Olson, *et al* (Ed.). Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. São Paulo: Manole, v.I, 2002

Burton, G. W. e M. G. Traber. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. Annu Rev Nutr, v.10, p.357-82. 1990.

Cardenas, V. M. A. Identificação dos ativos e o efeito das frações hidroalcoólica e acetato de etila de folhas de *Smallanthus sanchifolius* (yacón) sobre parâmetros bioquímicos em ratos Wistar normais e com diabetes induzida por estreptozocina. Universidade Federal do Paraná, Santa Bárbara, 2005.

Carlson, G. L., B. U. Li, *et al.* A bean alpha-amylase inhibitor formulation (starch blocker) is ineffective in man. Science, v.219, n.4583, Jan 28, p.393-5. 1983.

Ceriello, A. e E. Motz. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.24, n.5, May, p.816-23. 2004.

Chance, B., H. Sies, *et al.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev, v.59, n.3, Jul, p.527-605. 1979.

Christophersen, B. O. Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by a glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta, v.164, n.1, Sep 2, p.35-46. 1968.

_____. Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. Biochim Biophys Acta, v.176, n.3, Apr 29, p.463-70. 1969.

Concepcion Navarro, M., M. Pilar Montilla, *et al.* Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus tomentosus. Planta Med, v.59, n.4, Aug, p.312-4. 1993.

Cousins, R. J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. Physiol Rev, v.65, n.2, Apr, p.238-309. 1985.

Cumaoglu, A., G. Ozansoy, *et al.* Effect of long term, non cholesterol lowering dose of fluvastatin treatment on oxidative stress in brain and peripheral tissues of streptozotocin-diabetic rats. Eur J Pharmacol, v.654, n.1, Mar 1, p.80-5. 2011.

Czuczejko, J., B. A. Zachara, *et al.* Selenium, glutathione and glutathione peroxidases in blood of patients with chronic liver diseases. Acta Biochim Pol, v.50, n.4, p.1147-54. 2003.

Dahech, I., K. S. Belghith, *et al.* Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. Int J Biol Macromol, v.49, n.4, Nov 1, p.742-6. 2011.

Davies, K. J., A. Sevanian, *et al.* Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. Biochem J, v.235, n.3, May 1, p.747-54. 1986.

Del Maestro, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand Suppl, v.492, p.153-68. 1980.

Dobrina, A. e P. Patriarca. Neutrophil-endothelial cell interaction. Evidence for and mechanisms of the self-protection of bovine microvascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. J Clin Invest, v.78, n.2, Aug, p.462-71. 1986.

Erejuwa, O. O., S. A. Sulaiman, *et al.* Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Ann Endocrinol (Paris), v.71, n.4, Sep, p.291-6.

Erol, A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. Bioessays, v.29, n.8, Aug, p.811-8. 2007.

Evans, J. L., I. D. Goldfine, *et al.* Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev, v.23, n.5, Oct, p.599-622. 2002.

Faureand, P. L., J.L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: (Ed.). Birkhäuser, Basel, 1995. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation., p.237-249

Flohe, L. e W. A. Gunzler. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, v.105, p.114-21. 1984.

Fortson, W. C., F. J. Tedesco, *et al.* Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. J Clin Gastroenterol, v.7, n.6, Dec, p.502-5. 1985.

Frei, B., R. Stocker, *et al.* Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.24, Dec, p.9748-52. 1988.

Fridlyand, L. E. e L. H. Philipson. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab, v.8, n.2, Mar, p.136-45. 2006.

Funke, I. e M. Melzig. Traditionally used plants in diabetes therapy – phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. Revista Brasileira de Farmacognosia, p.1-5. 2006.

Gad, M. Z., M. M. El-Sawalhi, *et al.* Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants fenugreek and balanites. Mol Cell Biochem, v.281, n.1-2, Jan, p.173-83. 2006.

Ghosh, S. e S. A. Suryawanshi. Effect of Vinca rosea extracts in treatment of alloxan diabetes in male albino rats. Indian J Exp Biol, v.39, n.8, Aug, p.748-59. 2001.

Godin, D. V., S. A. Wohaieb, *et al.* Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. Mol Cell Biochem, v.84, n.2, Dec, p.223-31. 1988.

Gomes Rde, C., F. Bonamin, *et al.* Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of Vochysia tucanorum Mart. in the gastroprotection. J Ethnopharmacol, v.121, n.3, Jan 30, p.466-71. 2009.

Gonçalves, M. I. A. Plantas Usadas como medicinais pelos moradores da area urbana do Municipio de Santo Antonio de Leverger - Mato Grosso – Brasil Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 1999.

Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1647 p.

Gouveia, N. M. A., F.V.; Furtado, F.B; Scherer, D.L.; Mundim, A.V.; Espindola, F.S. Commercial phaseolamin treatment reduces glycemia and serum biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutrition Research, v.x, n.xx, p.xx. 2012.

Grankvist, K., S. L. Marklund, *et al.* CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem J, v.199, n.2, Nov 1, p.393-8. 1981.

Gray, A. M. e P. R. Flatt. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant Coriandrum sativum (coriander). Br J Nutr, v.81, n.3, Mar, p.203-9. 1999.

Gylfe, E. Nutrient secretagogues induce bimodal early changes in cytoplasmic calcium of insulin-releasing ob/ob mouse beta-cells. J Biol Chem, v.263, n.27, Sep 25, p.13750-4. 1988.

Habig, W. H., M. J. Pabst, *et al.* Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem, v.249, n.22, Nov 25, p.7130-9. 1974.

Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radic Res, v.31, n.4, Oct, p.261-72. 1999.

Hermes-Lima, M., W. G. Willmore, *et al.* Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. Free Radic Biol Med, v.19, n.3, Sep, p.271-80. 1995.

Hess, S. C., R. L. Brum, *et al.* Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). J Ethnopharmacol, v.47, n.2, Jul 7, p.97-100. 1995.

Hsieh, R. J. e J. E. Kinsella. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. Adv Food Nutr Res, v.33, p.233-341. 1989.

Huang, Z., Y. Ducharme, *et al.* The next generation of PDE4 inhibitors. Curr Opin Chem Biol, v.5, n.4, Aug, p.432-8. 2001.

Hultcrantz, R., H. Glaumann, *et al.* Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. Scand J Gastroenterol, v.21, n.1, Jan, p.109-13. 1986.

Hunt, J. V., C. C. Smith, *et al.* Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. Diabetes, v.39, n.11, Nov, p.1420-4. 1990.

Ilhan, N., I. Halifeoglu, *et al.* Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage. Cell Biochem Funct, v.19, n.3, Sep, p.207-12. 2001.

Jang, Y. Y., J. H. Song, *et al.* Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacol Res, v.42, n.4, Oct, p.361-71. 2000.

Kahn, B. B. e J. S. Flier. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest, v.106, n.4, Aug, p.473-81. 2000.

Kaiser, N., G. Leibowitz, *et al.* Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab, v.16, n.1, Jan, p.5-22. 2003.

Kakkar, R., J. Kalra, *et al.* Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. Mol Cell Biochem, v.151, n.2, Oct 18, p.113-9. 1995.

Kameswara Rao, B., P. Renuka Sudarshan, *et al.* Antidiabetic activity of *Terminalia pallida* fruit in alloxan induced diabetic rats. J Ethnopharmacol, v.85, n.1, Mar, p.169-72. 2003.

Kanner, J. e S. Harel. Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. Arch Biochem Biophys, v.237, n.2, Mar, p.314-21. 1985.

Khalil, N. M., M. T. Pepato, *et al.* Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. Biol Res, v.41, n.2, p.165-71. 2008.

Khan, A., G. Zaman, *et al.* Bay leaves improve glucose and lipid profile of people with type 2 diabetes. J Clin Biochem Nutr, v.44, n.1, Jan, p.52-6. 2009.

Kim, M. J., G. R. Ryu, *et al.* Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: in vivo and in vitro. Pancreas, v.26, n.3, Apr, p.292-9. 2003.

Kim, Y. A., C. S. Kong, *et al.* Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea*. Bioorg Med Chem Lett, v.22, n.13, Jul 1, p.4318-22.

Kotaru, M., K. Iwami, *et al.* In vivo action of alpha-amylase inhibitor from cranberry bean (*Phaseolus vulgaris*) in rat small intestine. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), v.35, n.6, Dec, p.579-88. 1989.

Kroncke, K. D., K. Fehsel, *et al.* Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. Biol Chem Hoppe Seyler, v.376, n.3, Mar, p.179-85. 1995.

Laemmli, U. K. e M. Favre. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. J Mol Biol, v.80, n.4, Nov 15, p.575-99. 1973.

Le Berre-Anton, V., C. Bompard-Gilles, *et al.* Characterization and functional properties of the alpha-amylase inhibitor (alpha-AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. Biochim Biophys Acta, v.1343, n.1, Nov 14, p.31-40. 1997.

Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia, v.51, n.2, Feb, p.216-26. 2008a.

_____. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. Biochem Soc Trans, v.36, n.Pt 3, Jun, p.343-7. 2008b.

Liu, S., M. Serdula, *et al.* A prospective study of fruit and vegetable intake and the risk of type 2 diabetes in women. Diabetes Care, v.27, n.12, Dec, p.2993-6. 2004.

Loomis, T. A. e A. W. Hayes. Essentials of Toxicology. Londres: Academic Press Limited. 1996. 282 p.

Low, P. A., K. K. Nickander, *et al.* The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. Diabetes, v.46 Suppl 2, Sep, p.S38-42. 1997.

Maiti, R., U. K. Das, *et al.* Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. Biol Pharm Bull, v.28, n.7, Jul, p.1172-6. 2005.

Malaisse, W. J. Glucose-sensing by the pancreatic B-cell: the mitochondrial part. Int J Biochem, v.24, n.5, May, p.693-701. 1992.

Marklund, S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.24, Dec, p.7634-8. 1982.

Marshall, J. A., S. Hoag, *et al.* Dietary fat predicts conversion from impaired glucose tolerance to NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. Diabetes Care, v.17, n.1, Jan, p.50-6. 1994.

Marshall, J. J. e C. M. Lauda. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. J Biol Chem, v.250, n.20, Oct 25, p.8030-7. 1975.

Martini, L. A., A. S. Catania, *et al.* Role of vitamins and minerals in prevention and management of type 2 diabetes mellitus. Nutr Rev, v.68, n.6, Jun, p.341-54.

Mates, J. M., C. Perez-Gomez, *et al.* Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem, v.32, n.8, Nov, p.595-603. 1999.

Mccord, J. M. e I. Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem, v.244, n.22, Nov 25, p.6049-55. 1969.

Mccord, J. M., R. S. Roy, *et al.* Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. Adv Myocardiol, v.5, p.183-9. 1985.

Meyer, K. A., L. H. Kushi, *et al.* Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women. Am J Clin Nutr, v.71, n.4, Apr, p.921-30. 2000.

Miller, D. M., G. R. Buettner, *et al.* Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. Free Radic Biol Med, v.8, n.1, p.95-108. 1990.

Misra, H. P. e I. Fridovich. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem, v.247, n.10, May 25, p.3170-5. 1972.

Montoya, C. A., P. Leterme, *et al.* Phaseolin type and heat treatment influence the biochemistry of protein digestion in the rat intestine. Br J Nutr, v.99, n.3, Mar, p.531-9. 2008.

Morales, S., J. A. Garcia-Salcedo, *et al.* [Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications]. Med Clin (Barc), v.136, n.7, Mar 19, p.298-302.

Mosca, M., C. Boniglia, *et al.* Determination of alpha-amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD. Anal Chim Acta, v.617, n.1-2, Jun 9, p.192-5. 2008.

Murphy, M. E. e H. Sies. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.23, Dec 1, p.10860-4. 1991.

Noh, S. K. e S. I. Koo. Enteral infusion of phosphatidylcholine increases the lymphatic absorption of fat, but lowers alpha-tocopherol absorption in rats fed a low zinc diet*. J Nutr Biochem, v.12, n.6, Jun, p.330-337. 2001.

Nwose, E. U., H. F. Jelinek, *et al.* The 'vitamin E regeneration system' (VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes--a hypothesis. Med Hypotheses, v.70, n.5, p.1002-8. 2008.

O'brien, B. A., B. V. Harmon, *et al.* Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. J Pathol, v.178, n.2, Feb, p.176-81. 1996.

Oberley, L. W. Free radicals and diabetes. Free Radic Biol Med, v.5, n.2, p.113-24. 1988.

Obiro, W. C., T. Zhang, *et al.* The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. Br J Nutr, v.100, n.1, Jul, p.1-12. 2008.

Ohaeri, O. C. Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. Biosci Rep, v.21, n.1, Feb, p.19-24. 2001.

Oneda, H., S. Lee, *et al.* Inhibitory effect of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas alpha-amylase and its thermal stability. J Biochem, v.135, n.3, Mar, p.421-7. 2004.

Orci, L. The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. Diabetologia, v.28, n.8, Aug, p.528-46. 1985.

Pandikumar, P., N. P. Babu, *et al.* Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. J Ethnopharmacol, v.124, n.1, Jul 6, p.111-5. 2009.

Pari, L. e M. Latha. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats. BMC Complement Altern Med, v.4, Nov 2, p.16. 2004.

Pari, L. e S. Venkateswaran. Effect of an aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes. Pharmazie, v.58, n.12, Dec, p.916-9. 2003.

Patel, C., P. Dadhaniya, *et al.* Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. Food Chem Toxicol, v.46, n.8, Aug, p.2728-35. 2008.

Pereira, L. L. S., C. A. Pereira, *et al.* White Bean Flour (*Phaseolus Vulgaris*): Therapeutic and Toxicological Research in Wistar Rats Journal of Applied Pharmaceutical Science, v.2. 2012.

Piedrola, G., E. Novo, *et al.* White blood cell count and insulin resistance in patients with coronary artery disease. Ann Endocrinol (Paris), v.62, n.1 Pt 1, Feb, p.7-10. 2001.

Pittler, M. H. e E. Ernst. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. Am J Clin Nutr, v.79, n.4, Apr, p.529-36. 2004.

Porter, N. A. Chemistry of lipid peroxidation. Methods Enzymol, v.105, p.273-82. 1984.

Powell, S. R. The antioxidant properties of zinc. J Nutr, v.130, n.5S Suppl, May, p.1447S-54S. 2000.

Rakieten, N., M. L. Rakieten, *et al.* Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep, v.29, May, p.91-8. 1963.

Rayman, M. P. The importance of selenium to human health. Lancet, v.356, n.9225, Jul 15, p.233-41. 2000.

Rellier, N., D. Ruggiero-Lopez, *et al.* In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. Life Sci, v.64, n.17, p.1571-83. 1999.

Robertson, R. P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. J Biol Chem, v.279, n.41, Oct 8, p.42351-4. 2004.

Robertson, R. P. e J. S. Harmon. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. Free Radic Biol Med, v.41, n.2, Jul 15, p.177-84. 2006.

_____. Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. FEBS Lett, v.581, n.19, Jul 31, p.3743-8. 2007.

Rolo, A. P. e C. M. Palmeira. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol, v.212, n.2, Apr 15, p.167-78. 2006.

Roman-Ramos, R., J. L. Flores-Saenz, *et al.* Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. J Ethnopharmacol, v.48, n.1, Aug 11, p.25-32. 1995.

Saddala, R. R., L. Thopireddy, *et al.* Regulation of cardiac oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with aqueous extract of *Pimpinella tirupatiensis* tuberous root. Exp Toxicol Pathol, Jun 1. 2011.

Santimone, M., R. Koukiekolo, *et al.* Porcine pancreatic alpha-amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (alpha-AI1) and structural changes in the alpha-amylase inhibitor complex. Biochim Biophys Acta, v.1696, n.2, Feb 12, p.181-90. 2004.

Sawada, S., Y. Takeda, *et al.* Primary structures of alpha- and beta-subunits of alpha-amylase inhibitors from seeds of three cultivars of *Phaseolus* beans. J Protein Chem, v.21, n.1, Jan, p.9-17. 2002.

Saxena, A. K., P. Srivastava, *et al.* Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. Biochem Pharmacol, v.45, n.3, Feb 9, p.539-42. 1993.

Schultes, R. E. e R. F. Raffauf. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. Portland: Dioscorides Press. 1990. 484 p.

Sefi, M., H. Fetoui, *et al.* *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. J Ethnopharmacol, v.135, n.2, May 17, p.243-50.

Sies, H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem, v.215, n.2, Jul 15, p.213-9. 1993.

Silva, M. A. B. Levantamento etnobotânico e triagem hipolipidêmica de Plantas Medicinais do Cerrado Mato-grossense: Avaliação da Atividade hipolipidêmica da *Simaba ferruginea* St. Hil. e *Vochysia rufa* Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

Stadtman, E. R. Role of oxidant species in aging. Curr Med Chem, v.11, n.9, May, p.1105-12. 2004.

Stinefelt, B., S. S. Leonard, *et al.* Free radical scavenging, DNA protection, and inhibition of lipid peroxidation mediated by uric acid. Ann Clin Lab Sci, v.35, n.1, Winter, p.37-45. 2005.

Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. Physiol Res, v.50, n.6, p.537-46. 2001.

Szkudelski, T. e K. Szkudelska. Anti-diabetic effects of resveratrol. Ann N Y Acad Sci, v.1215, Jan, p.34-9.

Tormo, M. A., I. Gil-Exojo, *et al.* Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. Br J Nutr, v.92, n.5, Nov, p.785-90. 2004.

_____. White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats. Br J Nutr, v.96, n.3, Sep, p.539-44. 2006.

Tubaro, E., B. Lotti, *et al.* Xanthine oxidase increase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations. Biochem Pharmacol, v.29, n.13, Jul 1, p.1945-8. 1980.

Uchigata, Y., H. Yamamoto, *et al.* Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. Diabetes, v.32, n.4, Apr, p.316-8. 1983.

Ugochukwu, N. H. e M. K. Cobourne. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. Clin Chim Acta, v.336, n.1-2, Oct, p.73-81. 2003.

Vaca, C. E., J. Wilhelm, *et al.* Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. Mutat Res, v.195, n.2, Mar, p.137-49. 1988.

Valko, M., D. Leibfritz, *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol, v.39, n.1, p.44-84. 2007.

Valko, M., C. J. Rhodes, *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact, v.160, n.1, Mar 10, p.1-40. 2006.

Van Dam, R. M., W. C. Willett, *et al.* Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. Diabetes Care, v.25, n.3, Mar, p.417-24. 2002.

Vasconcelos, S. M. L., M. O. F. Goulart, *et al.* Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. Química Nova, v.30(nº5), p.1323-1338. 2007.

Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? Quim. Nova, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, maio/jun. 2005.

Venkateswaran, S., L. Pari, *et al.* Effect of *Phaseolus vulgaris* on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes. J Med Food, v.5, n.2, Summer, p.97-103. 2002.

Wen, Y., J. C. Skidmore, *et al.* Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. Diabetes Obes Metab, v.4, n.5, Sep, p.305-8. 2002.

Weniger, B., A. Lobstein, *et al.* Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. Phytother Res, v.19, n.1, Jan, p.75-7. 2005.

Werns, S. W. e B. R. Lucchesi. Free radicals and ischemic tissue injury. Trends Pharmacol Sci, v.11, n.4, Apr, p.161-6. 1990.

West, I. C. Radicals and oxidative stress in diabetes. Diabet Med, v.17, n.3, Mar, p.171-80. 2000.

Wohaieb, S. A. e D. V. Godin. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. Diabetes, v.36, n.9, Sep, p.1014-8. 1987.

Wu, C., Y. Li, *et al.* Hypoglycemic effect of Belamcanda chinensis leaf extract in normal and STZ-induced diabetic rats and its potential active faction. Phytomedicine, v.18, n.4, Feb 15, p.292-7.

Wu, G., Y. Z. Fang, *et al.* Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr, v.134, n.3, Mar, p.489-92. 2004.

Xi, M., C. Hai, *et al.* Antioxidant and antiglycation properties of triterpenoid saponins from Aralia taibaiensis traditionally used for treating diabetes mellitus. Redox Rep, v.15, n.1, p.20-8.

Yamagishi, S., T. Matsui, *et al.* Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders. Curr Drug Metab, v.10, n.2, Feb, p.159-63. 2009.

Yamamoto, H., Y. Uchigata, *et al.* Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. Nature, v.294, n.5838, Nov 19, p.284-6. 1981.

Yamaoka, T. e M. Itakura. Development of pancreatic islets (review). Int J Mol Med, v.3, n.3, Mar, p.247-61. 1999.

Yaryura-Tobias, J. A., A. Pinto, *et al.* Anorexia nervosa, diabetes mellitus, brain atrophy, and fatty liver. Int J Eat Disord, v.30, n.3, Nov, p.350-3. 2001.

Yasuda, K., H. Kizu, *et al.* New sugar-mimic alkaloids from the pods of Angylocalyx pyraetii. J Nat Prod, v.65, n.2, Feb, p.198-202. 2002.

Yazdanparast, R., A. Ardestani, *et al.* Experimental diabetes treated with Achillea santolina: effect on pancreatic oxidative parameters. J Ethnopharmacol, v.112, n.1, May 30, p.13-8. 2007.

Yildirim, A., A. Mavi, *et al.* Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. J Agric Food Chem, v.49, n.8, Aug, p.4083-9. 2001.

Zucaro, Y. L., R. S. Compagnonea, *et al.* β -hydroxymaslinic acid, a triterpene from Vochysia ferruginea. J Braz Chem Soc, v.11, p.241-244. 2000.

Zuco, V., R. Supino, *et al.* Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. Cancer Lett, v.175, n.1, Jan 10, p.17-25. 2002.

Capítulo 2

Capítulo 2:

Artigo será enviado para Journal Ethnopharmacology (Fator de impacto 3,0)

Evaluation of antidiabetic and antioxidant effects of *Vochysia rufa* Mart. extract in pancreas of the streptozotocin-induced diabetic rats

Gouveia, N.M.^a; Rodovalho, A.B.^a; Sousa, R.M.^b; Bernardino Neto, M.^a; Oliveira, A.^b; Mundim, A.V.^c; Belleti, M.E.^d; Calábria, L.K.^{a,2}; Espindola, F.S.^{a,1}

^aInstituto de Genética e Bioquímica, ^bInstituto de Química, ^cFaculdade de Medicina Veterinária, ^dInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Av. Pará 1720, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

¹ Corresponding author:

Foued S. Espindola

Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica.

Av. Pará 1720

38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

Phone: 55 34 3218 2477.

e-mail address: fsespindola@gmail.com

² Present address: Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus avançado de Governador Valadares.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: stem bark aqueous macerated of *Vochysia rufa* has been popularly used in the treatment of diabetes Type 1 and Type 2 in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

Aim of the study: we evaluated the potential antihyperglycemic and antioxidant status of stem bark extract in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats.

Materials and methods: experimental diabetes was induced by a single dose of streptozotocin (40 mg/kg) injected into the penile vein. The animals received through oral gavage daily: water (D control group), *V. rufa* extract (500 mg/kg) (DV group) and glibenclamide (6 mg/kg) as a control drug (DG group). The levels of total antioxidant capacity (FRAP), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH) and sulfhydryl, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activities were measured in pancreas. Serum biochemical analysis and morphological analysis of pancreas were performed.

Results: the preliminary phytochemical analysis revealed the presence of saponins by Liebermann-Burchard test and was in agreement with infrared spectrum. Rats treated with *V. rufa* extract showed decrease of fasting blood glucose compared with D group. DV did not change the biochemical parameters, CAT and SOD activities and GSH levels, but significantly decreased GPx and GST activities and sulfhydryl levels compared with D groups. The *V. rufa* extract did not alter the morphological analysis of pancreas.

Conclusion: our results indicate that aqueous stem bark of *V. rufa* extract is capable of reduce the blood glucose and suggest antioxidant capacity in pancreatic tissue of STZ-diabetic rats.

Keywords: diabetes, oxidative stress, pancreas, *Vochysia rufa*, rats.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia due to an insufficiency of the secretion or action of insulin. According to the World Health Organization, more than 220 million people worldwide have diabetes (WHO, 2011). During diabetes, persistent hyperglycemia causes the increased production of free radicals, especially reactive oxygen species (ROS), in all tissues from glucose autoxidation and protein glycosylation (Hunt, Smith *et al.*, 1990; Robertson, 2004). The concentrations of ROS are modulated by antioxidant enzymes and non-enzymatic scavengers (Saxena, Srivastava *et al.*, 1993) such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The three primary scavenging enzymes have been demonstrated in different tissues of diabetic animals (Kakkar, Kalra *et al.*, 1995).

Compounds with antioxidant properties and free radical scavengers were shown to prevent pancreatic islets against cytotoxic effects of STZ (Afolayan e Sunmonu, 2011; Cumaoglu, Ozansoy *et al.*, 2011; Dahech, Belghith *et al.*, 2011; Erejuwa, Sulaiman *et al.*, 2010; Sefi, Fetoui *et al.*, 2011; Yazdanparast, Ardestani *et al.*, 2007; Ardestani, Yazdanparast *et al.*, 2008). Terpenoids and alkaloids were reported to have free radical scavenging activity and antioxidant capacity in diabetes (Jang, Song *et al.*, 2000; Yasuda, Kizu *et al.*, 2002).

In recent years, the traditional and complementary medicine has been sought for treatment of diabetes. Approximately 100 species of *Vochysia* (Vochysiaceae) are large trees and shrubs occurring throughout tropical America from Mexico to Peru. Several of these species have been used by traditional Amerindian communities in South America for a variety of therapeutic uses linked to inflammation, such as to treated skin sores and to relieve respiratory ailments such as asthma and pulmonary congestion (Schultes and Raffauf, 1990). Furthermore, the methanol extract of leaves of *Vochysia tucanorum* showed antiulcer activity by the presence of gastric pentacyclic triterpenes such as betulinic acid, betulinic acid epi, erythrodiol, and mixtures and derivatives ursólicos oleanolics (Gomes Rde, Bonamin *et al.*, 2009). The bark *Vochysia rufa* extract has phenolic compounds, coumarins, heterosides anthraquinone, triterpenoid and saponins (Silva, 2009). The antibacterial activity of the sericic acid, the main active constituent isolated from of the bark of *Vochysia divergens* extract, can also

explain and justify, the popular use of these plants to treat infectious diseases (Hess, Brum *et al.*, 1995).

Gomes Rde, Bonamin *et al.*, (2009) studying other species of *Vochysia* found gastroprotection and antioxidant *in vitro* activity for the methanolic extract and buthanolic fraction of *V. tucanorum* may associated to the presence of the triterpenes such as betulinic acid. Xi, Hai *et al* (2010) showed that the twelve triterpenoid saponins isolated from *Aralia taibaiensis* all displayed certain diabetes mellitus related antioxidant and antiglycation activities while Kim, Kong *et al.* (2012) found that *Salicronia herbacea* is capable of scavenging the DPPH radical and peroxyxynitrite and identified saponins. Moreover Pari and Latha, (2004) demonstrated that *Scoparia dulcis* showed the same effect in brain of diabetic rats. The antioxidant property of *V. rufa* may be accessible due to its chemical constituents.

V. rufa popularly known as “quina-doce” has been used in folk medicine to treat diabetes mellitus type 1 and type 2 in Uberlandia, Brazil. Although its antidiabetic effects and phytochemical profile are still unknown. Thus, we evaluated *V. rufa* stem bark extract in STZ-treated diabetic rats and its potential antihyperglycemic and pancreatic antioxidant status.

2. Materials and Methods

2.1 Plant material

Stem barks of *V. rufa* Mart. were collected in the Cerrado biome, in the outskirts of Abadia dos Dourados/MG, Brazil, (latitude 18° 27` 50.5” and longitude 47° 23` 37.2”) during of month of October-February, 2010/11. The plant material was botanically identified at the Institute of Biology of the Federal University of Uberlandia, and deposited in the University herbarium (HUFU) with voucher specimen number 58,888.

2.2 Preparation of the extract

V. rufa Mart. stem barks were dried in an oven at 35 °C and then powdered in an electric mill. The powder (200 g) was extracted with distilled water by maceration for 24 h (1:5 w/v). The extract was filtered and centrifuged at 4,400xg

for 15 min at 4 °C. The supernatant was frozen at -20 °C and then lyophilized to yield approximately 6% (w/w). The crude extract was stored at -20 °C until analysis.

2.3 Thin layer chromatographic (TLC) analysis

The TLC analysis of the crude extract solubilized in water was carried out using 60GF₂₅₄ silica gel plates (UV 250-366nm), eluted with chloroform:methanol:water (64:50:10) and stained with reagents standards. To reveal the classes of compounds were used as revealing universal UV and as a developer specific vanillin for flavonoids and tannins, Libermann-Buchard for steroids and pentacyclic triterpenoids, sulfuric anisaldehyde to terpenoids and steroids, Dragendorff for alkaloids and heterocyclic nitrogen compounds and ninhydrin for aminoacids.

2.4 Isolation and spectroscopy analyses by infrared and UV-VIS

The crude extract from the bark *V. rufa* was submitted to another extraction with MeOH: H₂O (7:3 v/v), centrifuged at 2,000xg for 10 min. The pellet was resuspended in MeOH and the procedure was repeated twice. Of the pellet was resuspended in water, frozen and lyophilized resulting in the aqueous fraction. The supernatant was rotary evaporated and then lyophilized and is called methanolic fraction. The methanolic fraction was recrystallized from cold MeOH and after filtration obtaining two fractions, the recrystallized and the MeOH washed.

The partition methanol: water (7:3) and the fractions were analyzed by infrared spectroscopy using a spectrometer Shimadzu IR-Prestige-21, with a resolution of 4 cm⁻¹ and accumulating 32 scans. The spectra were recorded with KBr pellets in the proportion of 1:100 (w m⁻¹). Spectroscopic UV-VIS analysis of scanned wavelength in spectrophotometer was performed in the Hitachi model U-2000. As used quartz cuvette, with the optical path of 10 mm, height 45 mm and a volume of 3.5 mL.

2.5 Protein analysis of the *V. rufa* extract

The protein content of the crude extract was estimated following a modifications of the Bradford assay (Bradford, 1976). N order to perform electrophoresis on polyacrylamide gel the extract were treated with 10%

trichloroacetic acid for 15min on ice, and centrifuged at 12,000xg for 10 min at 4 °C. The protein precipitate was then solubilized in a small volume of electrophoresis sample buffer containing an additional 100 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 25% glycerol, analyzed on a 5–22% gradient SDS-PAGE (Laemmli and Favre, 1973), and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.6 Detection of the glycoproteins in polyacrylamide gel (PAS)

The polyacrylamide gel was immersed in 12.5% trichloroacetic acid for 1 h and washed with water (3 x 10 min each). Thereafter, the gel remained 1% periodic acid for 1 h and washed with water. The gel was kept overnight in water and stained with a Schiff reagent for 1 h. After it was washed with 0.5% sodium metabisulphite and the reaction was stopped with 5% acetic acid.

2.7 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay

Antioxidant activity was determined using the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) following the method modified by Yildirim, Mavi *et al.*, (2001). The aqueous extract was diluted from 10 mg/mL to 75 mg/mL and 950 µL (40 µg/mL) of DPPH solution was mixed with 50 µL of extract (in water). The reaction mixture was vortex-mixed thoroughly and incubated at 30 °C in the dark for 20 min. Reduction in the absorbance of the mixture was measured at 517 nm using BHT as a control. Scavenging of DPPH radicals by the extract was calculated using the following formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / (\text{Abs control})] \times 100$$

Where: Abs-control is the absorbance of DPPH and Abs-sample is the absorbance of the DPPH radical + sample extract/standard.

2.8 Animals

Male Wistar rats that weighed 200-220 g were used for the animal studies and kept under standard conditions (22±1 °C, humidity 60±5% and 12 h light: 12 h dark cycle). Animals were fed with commercial pellet diet (65.82% carbohydrate, 5.36% fibre, 21.0% protein and 4.96% fat) (Bio base, SC, Brazil) and received water *ad libitum*. All the procedures for the handling, use, and euthanasia of the

animals were approved by the Ethics Committee in Animal Research of the Federal University of Uberlandia, Brazil (CEUA/UFU 060/10).

2.8.1 Acute toxicity study

In the acute toxicity study, the rats were divided into eight groups (n = 6), which were given different concentrations of aqueous extract of *V. rufa* (50, 100, 250, 500, 1000, 3000 to 5000 mg/kg body weight) by gavage as single dose. Furthermore, the control group received water. The animals were weighed at the beginning of the experiment.

The animals were fasted with water ad libitum for 12 hours and received the extract. After 30 minutes of administration the animals had free access to food and were observed at intervals of 5, 15, 30, 60 minutes, 3 h and 6 h. During 14 days the animals were assessed twice a day in the evening (16-18 h). The weight of the animals was also observed during treatment. We observed the following parameters: changes in skin, hair and eyes, presence of tremors, muscle tone, changes in salivation, defecation and urination, lethargy, sleep, arousal, muscle twitching, convulsions and death of animals.

2.8.2 Induction of diabetes mellitus

The rats were allowed to acclimate to their environment for one week and were subsequently fasted for 24 h. The rats were intraperitoneally anesthetized with xylazine/ketamine (1:1, v/v) followed by penile vein injection of 40 mg/kg of streptozotocin (STZ, Sigma-Aldrich). STZ was freshly dissolved in 0.01 M citrate buffer at pH 4.5 and the injection volume was 2 mL/kg. The animals were fasted for another 90 min after the injection. Ten days after the STZ injection, rats that had a fasting blood glucose level greater than 250 mg/dL were used for subsequent experiments.

2.8.3 Experimental design

The animals were divided into 6 groups of 10 animals each received the following treatments:

- (i) non diabetic controls (ND), the animals received 1 mL of distilled water for 43 days;

- (ii) non diabetic group treated with extract of *V. rufa* (500 mg/kg) (NDV) for 43 days;
- (iii) non diabetic group treated with glibenclamide (6 mg/kg) (NDG) for 43 days;
- (iv) control diabetic (D), the animals received 1 mL of distilled water for 43 days;
- (v) diabetic group treated with extract of *V. rufa* (500 mg/kg) (DV) for 43 days;
- (vi) diabetic group treated with glibenclamide (6 mg/kg) (DG) for 43 days;

The extract was diluted in distilled water and administrated in the afternoon by gavage for 43 days. Body weight and blood glucose levels were monitored. Blood glucose was monitored using reactive strips for blood glucose (Contour Glucose Test Strip) (Bayer, Mishawaka, USA). At the end of the experiment the animals were fasted for 12 h after anesthesia and blood samples were collected from the hepatic portal vein. Pancreas were dissected immediately, washed in saline (NaCl 0.9%), kept in liquid nitrogen and stored at -80 °C for biochemical analyzes and biomarkers of oxidative stress. Other portions of the pancreas were washed in saline and immediately fixed in buffered 10% formalin.

2.8.4 Serum biochemical measurements

The total cholesterol, triglyceride, urea, creatinine, alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (γ -GT), aspartate amino transferase (AST), and alanine amino transferase (ALT), HDL cholesterol (HDL-C), uric acid levels were determined from a serum sample. All of the parameters were measured in a Clinical Analysis Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Uberlandia with ChemWell Automated Analyzer equipment (Awareness Technology Inc., Florida, USA) via colorimetric methods using commercial kits (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brazil).

2.8.5 Tissue preparation

Four pancreas of each group were homogenized on ice in ten volumes of homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM dithiothreitol, 1 mM benzamidine, 0.5 mM fenilmetano sulfonyl fluoride, 0.5 mM aprotinin and 0.1 mM pefabloc). The homogenate was centrifuged at 10.000xg for 5 min at 4 °C. Proteins were measured by the Bradford method.

2.8.6 Biomarkers of oxidative stress in pancreas

The total antioxidant capacity (FRAP) was evaluated using the test described by Benzie and Strain, (1999). In this test the antioxidant present in the sample reduced Fe^{+2} to Fe^{+3} which is chelated by 2,4,6-tri (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), where the blue color and monitored at 593 nm. Lipid peroxidation in the pancreatic tissue was estimated colorimetrically by the method of Hermes-Lima, Willmore *et al.*, (1995), where it is determined the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results were expressed in nmol.g^{-1} of the tissue. Sulfhydryl levels were determined using 5, 5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), as described by Faureand, (1995). The glutathione S-transferase was determined by the method of Habig, Pabst *et al.*, (1974). The decrease in absorbance was measured at 340 nm.

2.8.7 Activity of antioxidant enzymes

Catalase activity (CAT) was determined by monitoring decomposition of hydrogen peroxide at 240 nm (Aebi, Suter *et al.*, 1968). The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by inhibition of adenocromo during the oxidation of adrenaline. The results were expressed as unit of SOD/ μg of protein (Misra and Fridovich, 1972). The activity of glutathione peroxidase (GPx) was quantified by the oxidation of NADPH in the presence of glutathione reductase (GR), measured at 340 nm and expressed in $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (Flohe and Gunzler, 1984). The amount of reduced glutathione (GSH) concentration was determined by the method of Beutler, Duron *et al.*, (1963), in combination with DTNB homogenate acid based on the reaction of glutathione with the DTNB to form a thiol (TNB) of yellow color.

2.8.8 Morphological analysis of pancreas

The pancreas was fixed in 10% formalin. Thereafter, the tissue was placed in cassettes in automatic processor equipment Histotechnical PT 05. The tissue was dehydrated in ethanol baths, diaphanized in xylene and embedded in paraffin. 4 μm sections were stained with phloxine alpha-naphthol (Behmer, 1978). For quantitative analysis the number of islets and islets percentage relative to the slice area of all images were captured and analyzed subsequently cut in HL-image 97, western vision software.

2.9 Statistical analysis

The data was reported as medians (interquartile range). The groups were compared by the Kruskal-Wallis test for differences in more than two populations followed by the Student-Newman-Keuls post-test. The comparisons between two independent groups were made used Mann–Whitney test, also known as experimental and control. For all tests, $p < 0.08$ was considered statistically significant. For statistical analysis we used the BioStat version 5.0 statistical software.

3. Results

3.1 Phytochemical screening of *V. rufa*

TLC for chemical identification of the constituents of *V. rufa* was positive for Libermann-Buchard, sulfuric anisaldehyde and ninhydrin revealing the presence of terpenes (R_f 0.7) and proteins. In the UV-VIS spectrum, it was analyzed the absorbance profile of the MeOH fraction as well as the absorbance of the recrystallized and MeOH washed fractions, as shown in Figure 1. The recrystallized did not showed an absorbance peak at 350 nm as observed in the initial MeOH fraction.

The data from infrared spectrum of recrystallized and MeOH washed fractions showed a spectral band related to the stretch of the OH from glycosides groups. One can also notice the presence, in both spectra, of the carboxylic acid by the following features: a) bandwidth in the region of $3400\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ due to the stretching of OH acid, b) band in the region of 1700 cm^{-1} due to stretching of the carbonyl acid and, c) band in the region of 1400 cm^{-1} due to angular deformation in the plane C-O-H. The only differences between the two spectrum were due to the MeOH washed fraction provided a wider bandwidth in the region of 1700 cm^{-1} , suggesting that this enlargement were stretching of C = C bond, suggesting the presence of the saponins (Figure 2).

3.2 Protein analysis of the *V. rufa* extract

The figure 3A shows the protein profiles of the *V. rufa* extract. The extract contained some polypeptides. Figure 3B shows the presence of a glycoprotein band of the 97 kDa stained with a Schiff reagent.

3.3 In-vitro antioxidant activity: inhibition of DPPH radicals

The DPPH radical scavenging activity of the aqueous extracts of the *V. rufa* was compared with BHT (Figure 4). The extract inhibited 48% of free radical scavenging activity at 75 mg/mL.

3.4 Acute toxicity study

The extract did not show any sign and symptoms of toxicity and mortality up to 5000 mg/kg dose.

3.5 Effect of the *V. rufa* extract on blood glucose and body weight

The blood glucose and body weight of diabetic animals that received *V. rufa* (500 mg/kg) during 43 days are listed in Figure 5. There was no significant decrease in the body weight of treated experimental group for 43 days of administration of the extract or glibenclamide. There was a progressive and significant increase in the body weight of ND whereas D showed a decrease in body weight. A significant increase in blood glucose level was observed in D rats compared with ND rats. After 21 days the blood glucose levels of treated rats with extract were considered significantly ($p<0.08$) lower than in the D group (Figure 5). After 43 days of the experiment DV tended to decrease blood glucose levels, but was not significant compared with D group. The blood glucose levels, when compared before and after treatment, to the groups DV and DG showed lower glycemic levels, about 55% and 237%, respectively.

3.6 Effect of *V. rufa* extract on parameters biochemical

NDV and NDG rats increased aspartate aminotransferase (AST) ($p<0.01$) levels compared to ND rats. DV compared to D group showed no alterations in the biochemical parameters, while DG compared to D group increased uric acid ($p<0.01$) levels (Table 1).

3.7 Effect of *V. rufa* extract on biomarkers of oxidative stress in pancreas

In diabetic pancreas homogenates we found increased sulfhydryl and TBARS levels ($p<0.001$), moreover, decreased GSH levels ($p<0.001$). *V. rufa* and glibenclamide treatment did not change significantly GSH levels, but significantly decreased sulfhydryl ($p<0.01$) levels in D groups (Figure 6). The treated NDV group showed increased FRAPS ($p<0.01$) and TBARS ($p<0.05$) levels and NDG group showed decreased level of TBARS ($p<0.07$) and increased GSH ($p<0.01$) and FRAP ($p<0.01$) levels.

3.8 Effect of *V. rufa* extract on activity of antioxidant enzymes in pancreas

In diabetic pancreas homogenates we found increased catalase ($p<0.01$), GPx ($p<0.001$) and GST ($p<0.001$) activities. *V. rufa* treatment did not change catalase, but significantly decreased GPx ($p<0.001$) and GST ($p<0.06$) activity in D groups (Figure 7). In contrast, glibenclamide reduced catalase ($p<0.01$), GPx ($p<0.001$), and GST ($p<0.01$) activity. The treated NDV group showed increased SOD ($p<0.07$) activity and NDG increased GST ($p<0.01$) activity.

3.9 Effect of *V. rufa* extract on morphology in pancreas

The results of histomorphological examinations are shown in Figure 8 and Table 2. STZ administration caused severe injury to the pancreas, such as a decrease in the number of islet cells and reduction in the diameter of pancreatic islets in relation to the slice area. The *V. rufa* and glibenclamide extract did not alter the parameters analyzed. Rats treated with *V. rufa* or glibenclamide did not significantly alter the number of islets and the percentage of islets diameter in relation to the slice area.

4. Discussion

Our preliminary investigation with stem bark aqueous extract of *V. rufa* showed the presence of saponins revealed by Liebermann-Burchard test and in agreement with the spectral analysis. The spectral analysis of recrystallized fraction after methanol extraction of the crude extract, suggested that it contains

sugar units derived from breakdown of glycosidic linkages of saponins. On the other hand, the methanol washed fraction showed by spectral analysis, the presence of saponins. Up to date, it has not been demonstrated data about isolation and characterization of compounds found in *V. rufa*. A study with *V. rufa* bark methanolic extract (Silva, 2009) reported the presence of triterpenoid and saponins besides phenolic compounds, coumarins, anthraquinone heterosides. Corroborating with our data, triterpenes were described in others *Vochysia* species such as *V. divergens* (Hess, Brum *et al.*, 1995), *V. ferruginea* (Zucaro, Compagnone *et al.*, 2000), *V. pacifica* (Weniger, Lobstein *et al.*, 2005) and *V. tucanorum* (Gomes Rde, Bonamin *et al.*, 2009).

Ethnobotanical study conducted at Mato Grosso state (Brazil) (referred to *V. rufa*) have used to treat colds and parasite diseases (Gonçalves, 1999). In Uberlandia, Minas Gerais, Brazil *V. rufa* has been used by patients with type 2 diabetes mellitus to glycemic control. It has been also reported by a doctor, who working in a Primary Health Care Unit, that his patient with type 1 diabetes mellitus reduced by 50% the use of insulin after the use of *V. rufa* stem bark aqueous macerate. The present study reports for the first time the effects of *V. rufa* as a hypoglycemic, antihyperglycemic and, antioxidant agent in experimental animal model of induced diabetes, thus scientifically validating the traditional claim.

A single oral administration of 5000 mg/Kg of *V. rufa* did not produce any sign of acute toxicity and mortality in the animals. Similar results have been showed by Gomes Rde, Bonamin *et al.*, (2009) administrating methanolic leaf extract of *V. tucanorum* and Silva, (2009) administrating methanolic bark extract of *V. rufa*. According to Loomis e Hayes, (1996) substances until 5000 mg/kg have been considered nontoxic. These data allowed the continuation of further pharmacological studies with this extract.

The untreated diabetic rats had higher blood glucose levels and lower body weight when non-diabetic controls. Interestingly, the DV group significantly improved glucose levels than compared to D group; moreover DV group reduced glucose levels compared after and before treatment. The administration of *V. rufa* decreased glucose levels similar to glibenclamide. In diabetic conditions, postprandial blood glucose level is not controlled efficiently due to insufficient insulin secretion (Wu, Li *et al.*). The control of blood glucose levels after 43 days of

treatment not were supported by morphology analysis of the pancreas. Thus, possibly *V. rufa* does not decrease blood glucose by increased in the pancreatic secretion of insulin from existing β -cells.

The diabetic rats showed an increase of urea, AST, ALT, ALP, HDL-C and LDL levels compared to non diabetic rats. Elevation of the serum urea and creatinine, as significant markers, are related to renal dysfunction in diabetic hyperglycemia (Almdal e Vilstrup, 1988). Serum enzymes including ALP and ALT are used in the evaluation of hepatic disorders. An increase in these enzyme activities reflects active liver damage (Fortson, Tedesco *et al.*, 1985; Hultcrantz, Glaumann *et al.*, 1986). The extract decrease the glycemic levels, however does not alter AST, ALT and ALP levels in diabetic rats. STZ produces an increase in reactive oxygen species causing lipid peroxidation in the membrane of the adipose tissue. In this view, STZ causes an increase lipid peroxidation and thus releasing hepatic enzymes. However *V. rufa* reduce glycemic levels, but did not alter liver enzymes or lipid peroxidation in diabetic rats. In non-diabetic rats was an increase in peroxidation and AST levels.

The treatment with this extract did not affect the total cholesterol and triglyceride levels, suggesting that this extract did not affect lipid metabolism. Pandikumar, Babu *et al.*, (2009) showed similar results in diabetic rats.

Besides the metabolic alterations caused by diabetes, chronic hyperglycemia promotes endogen free radical generation and depletes antioxidant defense systems. Pancreatic damage is also important point in the development of diabetes and its complications. The pancreatic β -cells are highly prone to oxidative stress and damage because they have low expression and activity of antioxidant enzymes, which are the first line of defense against oxidative insult (Lenzen, 2008b). We observed the increased of CAT, GPx and GST activities and TBARS, sulfhydryl levels and reduced GSH level in diabetic rats compared to non diabetic rats. Similar results were showed by others studies in pancreas of diabetic such as increase in CAT, GPx and GST activities (Cumaoglu, Ozansoy *et al.* 2011), SOD and CAT activities (Kakkar, Kalra *et al.*, 1995), increased activity of GPx (Erejuwa, Sulaiman *et al.* 2010). Cumaoglu, Ozansoy *et al.* (2011) corroborated with the data found here that the flavonoid, fluvastatin, did not change SOD activity in pancreas of diabetic rats. The elevated GPx activity in the diabetic rat pancreas might be a

compensatory mechanism to detoxify organic and inorganic peroxides including excess hydrogen peroxide generated by increased SOD activity (Christophersen, 1969; Dobrina and Patriarca, 1986). Glutathione peroxidase (GPx) is reported to have a broader protective spectrum compared to CAT because in addition to H_2O_2 , it also metabolizes other hydroperoxides including lipid hydroperoxides (Christophersen, 1968). The accumulation of H_2O_2 and other hydroperoxides might have induced the activity of GPx leading to its up-regulation in the diabetic rats. The observation that rodent and human islets have reduced expression of GPx has led to the conclusion that a normal approach for protection of β -cells against oxidative stress would involve over-expression of GPx (Robertson e Harmon, 2007). Thus, the over-expression of GPx could be a protective mechanism against oxidative stress. Our results showed that the administration of *V. rufa* extract also decreases significantly GPx and GST activity and sulfhydryl levels in diabetic rats. Similarly glibenclamide reduced CAT, GPx and GST activities and TBARS levels in diabetic rats. In NDV group increased FRAP levels, similar to NDG. GPx has a complementary catalytic activity with catalase. The k_m value of GPx ($k_m = 0.25\text{mmol/L}$) is lower than catalase ($k_m = 25\text{ mmol/L}$), providing a preferential pathway for degradation of low concentration of H_2O_2 in intact cells (Ugochukwu e Cobourne, 2003). For this reason the treatments had no effect on catalase.

Similar to our data, Ardestani, Yazdanparast *et al.*, (2008) showed decrease of GSH levels in the pancreas of diabetic rats compared to non diabetic rats. GSH is a major intracellular redox buffer that participates in the cellular defense system against oxidative stress by scavenging free radicals and reactive oxygen intermediates (Wu, Fang *et al.*, 2004). Thus, the decrease in pancreatic GSH levels in the diabetic rats might reflect a direct reaction between GSH and the free radicals generated by hyperglycemia in diabetes mellitus.

The elevated pancreatic lipid peroxidation in the diabetic rats can be attributed to enhanced production of reactive oxygen species, which leads to oxidative stress (Ilhan, Halifeoglu *et al.*, 2001). A change in protein usually occurs by the product of lipid peroxidation mainly reaching the sulfhydryl groups, forming disulphide groups. Thus, increased levels of sulfhydryl groups of diabetic rats are

related to the increase of TBARS levels. However, the extract of *V. rufa* reduced sulfhydryl groups levels, but reduction of TBARS levels was not observed.

The *V. rufa* extract showed potent antioxidant activity *in vitro*, supported to by increased FRAP in non diabetic rats treated and reduction enzymes antioxidants. In our study, we showed the presence of the saponins in the *V. rufa* extract, which may be responsible for scavenging free radicals, released by STZ and thus enhance both enzymatic and non-enzymatic antioxidants in diabetic rats treated.

In conclusion, our results indicated that aqueous stem bark of *V. rufa* extract is capable to reduce the blood glucose alleviating oxidative stress parameters in pancreatic tissue of STZ-diabetic rats. These protections on pancreas against oxidative stress might also partially have contributed to the antihyperglycemic effect of *V. rufa* in diabetic rats. The *V. rufa* extract appears to be a possible candidate for pharmaceutical evaluation pending full structural characterization of the active compounds having antidiabetic and antioxidative activities.

This is the first report of the antioxidant and antidiabetic effect of aqueous extract of *V. rufa*. Therefore, further studies to characterize saponins in this extract and determination of the mechanism of action needs to be done.

Acknowledgments

This work was supported by the Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)-Brazil (grant number APQ-01271-10 to FSE). This work also received support by fellowship to NMG and LKC (CAPES), ABR (FAPEMIG) and by Rede Fitocerrado which is a non-governmental organization based in Uberlandia. We would also like to thank the School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlandia, lab technician Felipe Cezar Gonçalves for his help in biochemical analyses.

References

Aebi, H., Suter, H. and Feinstein, R.N., 1968. Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem Genet* 2, 245-251.

Afolayan, A.J. and Sunmonu, T.O., *Artemisia afra* Jacq. ameliorates oxidative stress in the pancreas of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 2083-2086.

Almdal, T.P. and Vilstrup, H., 1988. Strict insulin therapy normalises organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 31, 114-118.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. and Jamshidi, S., 2008. Therapeutic effects of *Teucrium polium* extract on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 11, 525-532.

Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299, 15-27.

Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B.M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61, 882-888.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Christophersen, B.O., 1968. Formation of monohydroxy-polyenic fatty acids from lipid peroxides by a glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 164, 35-46.

Christophersen, B.O., 1969. Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 176, 463-470.

Cumaoglu, A., Ozansoy, G., Irat, A.M., Aricioglu, A., Karasu, C. and Ari, N., Effect of long term, non cholesterol lowering dose of fluvastatin treatment on oxidative stress in brain and peripheral tissues of streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 654, 80-85.

Dahech, I., Belghith, K.S., Hamden, K., Feki, A., Belghith, H. and Mejdoub, H., Antidiabetic activity of levan polysaccharide in alloxan-induced diabetic rats. *Int J Biol Macromol* 49, 742-746.

Dobrina, A. and Patriarca, P., 1986. Neutrophil-endothelial cell interaction. Evidence for and mechanisms of the self-protection of bovine microvascular endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *J Clin Invest* 78, 462-471.

Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S., Sirajudeen, K.N., Salleh, M.S. and Gurtu, S., Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Endocrinol (Paris)* 71, 291-296.

Faureand, P.L., J.L., 1995. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. Birkhäuser, Basel, pp. 237-249.

Flohe, L. and Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol 105, 114-121.

Fortson, W.C., Tedesco, F.J., Starnes, E.C. and Shaw, C.T., 1985. Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease. J Clin Gastroenterol 7, 502-505.

Gomes Rde, C., Bonamin, F., Darin, D.D., Seito, L.N., Di Stasi, L.C., Dokkedal, A.L., Vilegas, W., Souza Brito, A.R. and Hiruma-Lima, C.A., 2009. Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. in the gastroprotection. J Ethnopharmacol 121, 466-471.

Gonçalves, M.I.A., 1999. Plantas Usadas como medicinais pelos moradores da area urbana do Municipio de Santo Antonio de Leverger - Mato Grosso – Brasil Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249, 7130-7139.

Hermes-Lima, M., Willmore, W.G. and Storey, K.B., 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. Free Radic Biol Med 19, 271-280.

Hess, S.C., Brum, R.L., Honda, N.K., Cruz, A.B., Moretto, E., Cruz, R.B., Messana, I., Ferrari, F., Cechinel Filho, V. and Yunes, R.A., 1995. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). J Ethnopharmacol 47, 97-100.

Hultcrantz, R., Glaumann, H., Lindberg, G. and Nilsson, L.H., 1986. Liver investigation in 149 asymptomatic patients with moderately elevated activities of serum aminotransferases. Scand J Gastroenterol 21, 109-113.

Hunt, J.V., Smith, C.C. and Wolff, S.P., 1990. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. Diabetes 39, 1420-1424.

Ilhan, N., Halifeoglu, I. and Ozercan, H.I., 2001. Tissue malondialdehyde and adenosine triphosphatase level after experimental liver ischaemia-reperfusion damage. Cell Biochem Funct 19, 207-212.

Jang, Y.Y., Song, J.H., Shin, Y.K., Han, E.S. and Lee, C.S., 2000. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacol Res 42, 361-371.

Kakkar, R., Kalra, J., Mantha, S.V. and Prasad, K., 1995. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. Mol Cell Biochem 151, 113-119.

Kim, M.J., Ryu, G.R., Chung, J.S., Sim, S.S., Min, D.S., Rhie, D.J., Yoon, S.H., Hahn, S.J., Kim, M.S. and Jo, Y.H., 2003. Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: in vivo and in vitro. *Pancreas* 26, 292-299.

Kim, Y.A., Kong, C.S., Lee, J.I., Kim, H., Park, H.Y., Lee, H.S., Lee, C. and Seo, Y., Evaluation of novel antioxidant triterpenoid saponins from the halophyte *Salicornia herbacea*. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 4318-4322.

Laemmli, U.K. and Favre, M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 80, 575-599.

Lenzen, S., 2008. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36, 343-347.

Loomis, T.A. and Hayes, A.W., 1996. *Essentials of Toxicology*. Academic Press Limited, Londres.

Misra, H.P. and Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170-3175.

Pandikumar, P., Babu, N.P. and Ignacimuthu, S., 2009. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam. in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 124, 111-115.

Pari, L. and Latha, M., 2004. Protective role of *Scoparia dulcis* plant extract on brain antioxidant status and lipidperoxidation in STZ diabetic male Wistar rats. *BMC Complement Altern Med* 4, 16.

Rakieten, N., Rakieten, M.L. and Nadkarni, M.V., 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 29, 91-98.

Robertson, R.P., 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279, 42351-42354.

Robertson, R.P. and Harmon, J.S., 2007. Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett* 581, 3743-3748.

Saddala, R.R., Thopireddy, L., Ganapathi, N. and Kesireddy, S.R., Regulation of cardiac oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with aqueous extract of *Pimpinella tirupatiensis* tuberous root. *Exp Toxicol Pathol*.

Saxena, A.K., Srivastava, P., Kale, R.K. and Baquer, N.Z., 1993. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol* 45, 539-542.

Schultes, R.E. and Raffauf, R.F., 1990. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. Dioscorides Press, Portland.

Sefi, M., Fetoui, H., Lachkar, N., Tahraoui, A., Lyoussi, B., Boudawara, T. and Zeghal, N., Centaurium erythraea (Gentianaceae) leaf extract alleviates streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. J Ethnopharmacol 135, 243-250.

Silva, M.A.B., 2009. Levantamento etnobotânico e triagem hipolipidêmica de Plantas Medicinais do Cerrado Mato-grossense: Avaliação da Atividade hipolipidêmica da Simaba ferruginea St. Hil. e Vochysia rufa Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

Ugochukwu, N.H. and Cobourne, M.K., 2003. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from Gongronema latifolium leaves. Clin Chim Acta 336, 73-81.

Weniger, B., Lobstein, A., Um, B.H., Vonthron-Senechau, C., Anton, R., Usuga, N.J., Basaran, H. and Lugnier, C., 2005. Bioactive triterpenoids from Vochysia pacifica interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. Phytother Res 19, 75-77.

Wu, C., Li, Y., Chen, Y., Lao, X., Sheng, L., Dai, R., Meng, W. and Deng, Y., Hypoglycemic effect of Belamcanda chinensis leaf extract in normal and STZ-induced diabetic rats and its potential active faction. Phytomedicine 18, 292-297.

Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. and Turner, N.D., 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr 134, 489-492.

Xi, M., Hai, C., Tang, H., Wen, A., Chen, H., Liu, R., Liang, X. and Chen, M., Antioxidant and antiglycation properties of triterpenoid saponins from Aralia taibaiensis traditionally used for treating diabetes mellitus. Redox Rep 15, 20-28.

Yasuda, K., Kizu, H., Yamashita, T., Kameda, Y., Kato, A., Nash, R.J., Fleet, G.W., Molyneux, R.J. and Asano, N., 2002. New sugar-mimic alkaloids from the pods of Angylocalyx pynaertii. J Nat Prod 65, 198-202.

Yazdanparast, R., Ardestani, A. and Jamshidi, S., 2007. Experimental diabetes treated with Achillea santolina: effect on pancreatic oxidative parameters. J Ethnopharmacol 112, 13-18.

Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.A., 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. J Agric Food Chem 49, 4083-4089.

Zucaro, Y.L., Compagnonea, R.S. and Hess, S.C., 2000. β -hydroxymaslinic acid, a triterpene from Vochysia ferruginea. J Braz Chem Soc 11, 241-244.

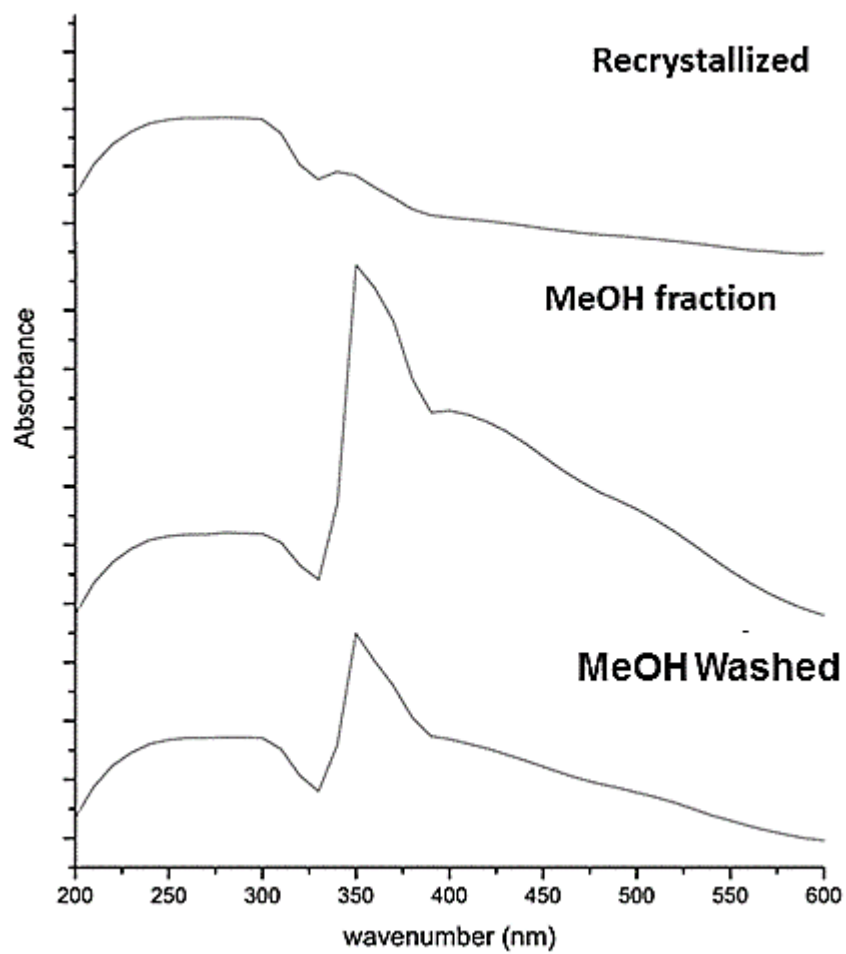


Figure 1. UV-Vis spectrum of 200-600 nm.

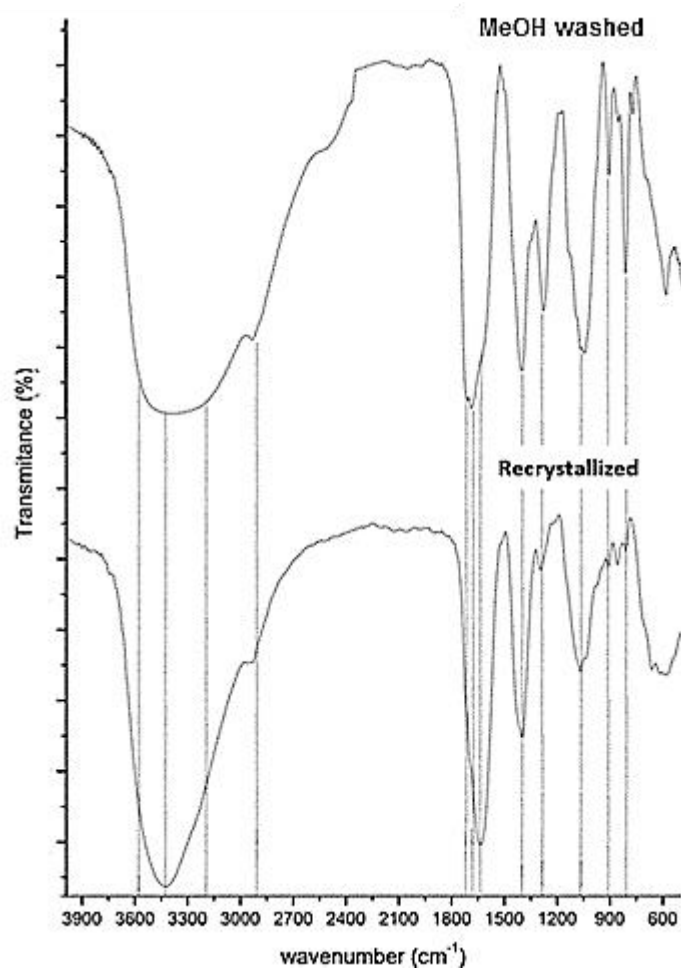


Figure 2: Infrared spectrum of methanol wash and recrystallized.

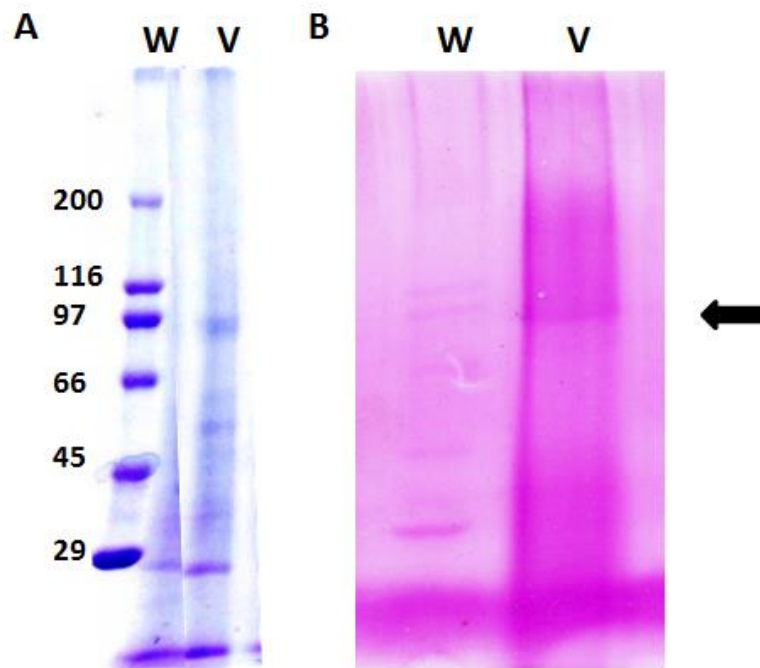


Figure 3: (A) Protein profiles by SDS-PAGE of the *Vochysia* extract. (B) Detection glycoproteins polyacrylamide gel (PAS). The arrow shows a protein band marked. Lanes W – molecular weight markers, V- *Vochysia* extract.

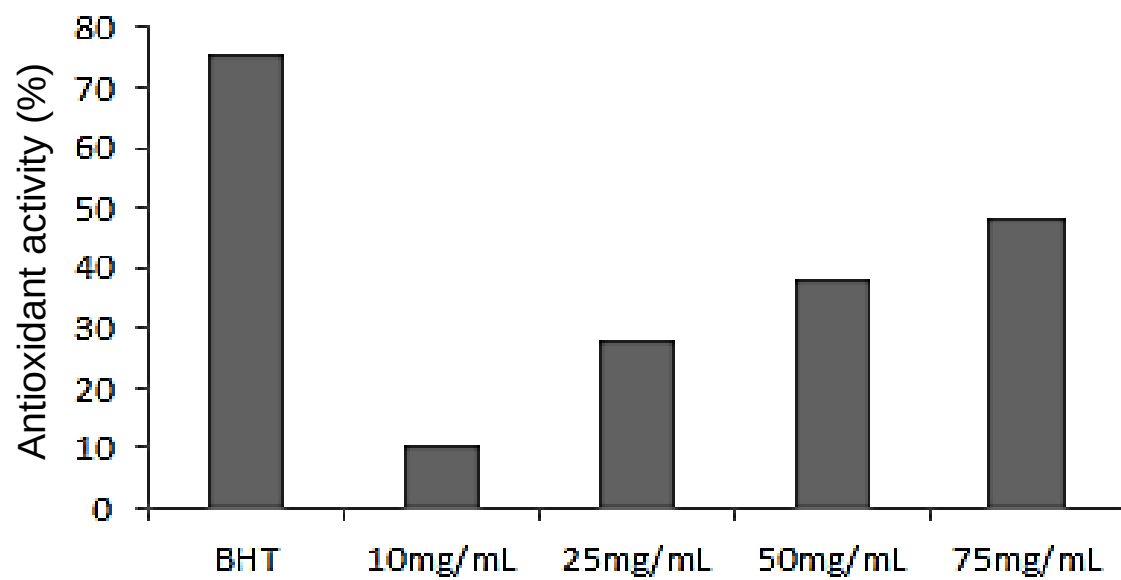


Figure 4: Antioxidant activity of *V. rufa* extract at several concentrations.

Body weight	Day 0	Day 21	Day 43	Body weight gain (g/rat)
ND	264,4±1,5	336,6±26,3	361,4±45,2	97
D	229,8±35,6*	226,8±17,3*	218,6±23,2*	-11,2*
DV	232,0±19,5	232,8±17,9	227,4±24,2	-4,6
DG	238,6±32,7	257,6±48,4	259,8±54,3	21,2

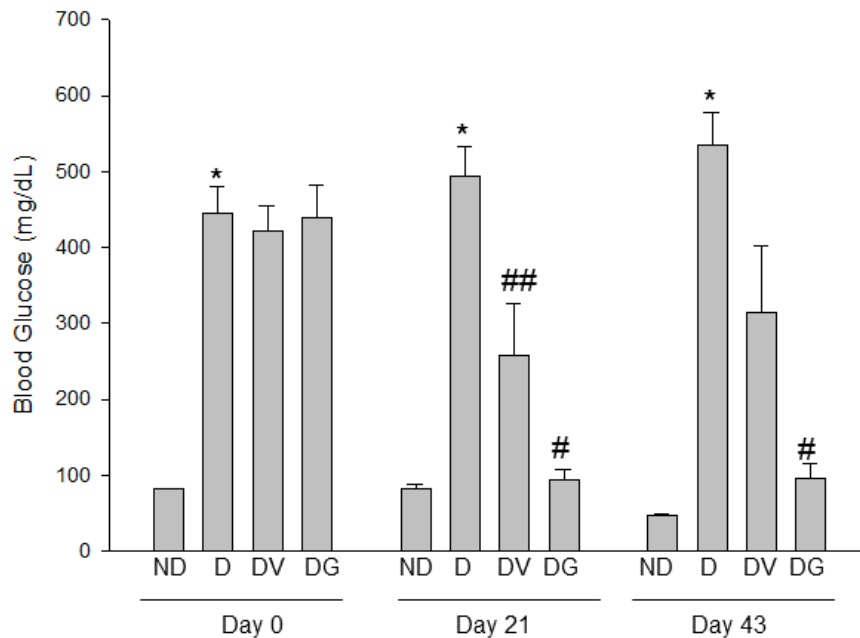


Figure 5: Changes in serum blood glucose and body weight in diabetic rats after daily administration of water (ND and D), 500 mg/kg of *V. rufa* extract (DV), or 6 mg/kg of glibenclamide (DG) after 43 days of treatment. The data represent the mean $\pm$ S.E.M for five rats. Values are statistically significant at $*p<0.01$, compared with control non diabetic (ND); $^{\#}p<0.01$ $^{##}p<0.08$ compare with control diabetic (D).

Table 1: The total cholesterol, triglyceride, creatinine, urea, alkaline phosphatase (ALP), γ -GT, aspartate amino transferase (AST), and alanine amino transferase (ALT) levels of non-diabetic (ND) and diabetic (D) rats after daily administration of water, 500 mg/kg of *Vochysia rufa* extract (V), or 6 mg/kg of glibenclamide (G) after 43 days of treatment.

Parameters	ND	NDV	NDG	D	DV	DG
Cholesterol (mg/dL)	45.70 (12.10)	45.70 (11.82)	35.40 (8.72)	53.80 (19.92)	57.75 (22.60)	48.80 (13.67)
Triglycerides (mg/dL)	73.50 (80.17)	67.55 (22.60)	65.50 (25.00)	112.70 (84.70)	112.00 (66.65)	94.05 (87.40)
HDL-C	17.55 (5.47)	19.25 (2.42)	16.60 (3.80)	23.50 (3.65)*	20.05 (2.75)	22.45 (4.80)
VLDL	14.70 (16.03)	13.51 (4.52)	13.10 (5.00)	22.54 (16.94)	22.40 (15.53)	18.81 (17.48)
LDL	14.42 (8.12)	11.96 (16.66)	12.34 (9.44)	12.12 (5.29)*	25.41 (16.72)	11.74 (4.72)
Creatinine (mg/dL)	0.63 (0.10)	0.55 (0.13)	0.66 (0.17)	0.50 (0.11)	0.57 (0.10)	0.64 (0.23)
Urea (mg/dL)	26.70 (12.72)	36.45 (14.22)	39.25 (25.42)	67.20 (20.60)*	76.95 (19.10)	71.70 (10.55)
Acid uric (mg/dL)	1.41 (4.33)	1.06 (0.95)	0.83 (0.76)	0.93 (1.05)	1.17 (0.72)	6.00 (4.42)***
ALP (U/L)	208.05 (71.47)	193.80 (65.85)	192.75 (60.17)	1330.75 (461.07)*	917.50 (439.02)	1128.45 (373.67)
γ-GT (U/L)	8.00 (8.87)	8.65 (12.70)	9.15 (5.05)	11.25 (33.7)	10.50 (5.65)	7.15 (10.9)
AST (U/L)	90.50 (17.50)	108.50 (16.00)**	102.00 (34.25)**	490.00 (520.00)*	190.00 (150.00)	320.00 (255.00)
ALT (U/L)	86.00 (30.50)	90.50 (11.50)	86.00 (15.00)	345.00 (307.50)*	180.00 (50.00)	220.00 (317.5)

Data are expressed as median (IQR- interquartile range), n=10. * $p < 0.05$ compare D vs ND; ** $p < 0.05$ compare with control non diabetic (ND); *** $p < 0.05$ compare with control diabetic (D).

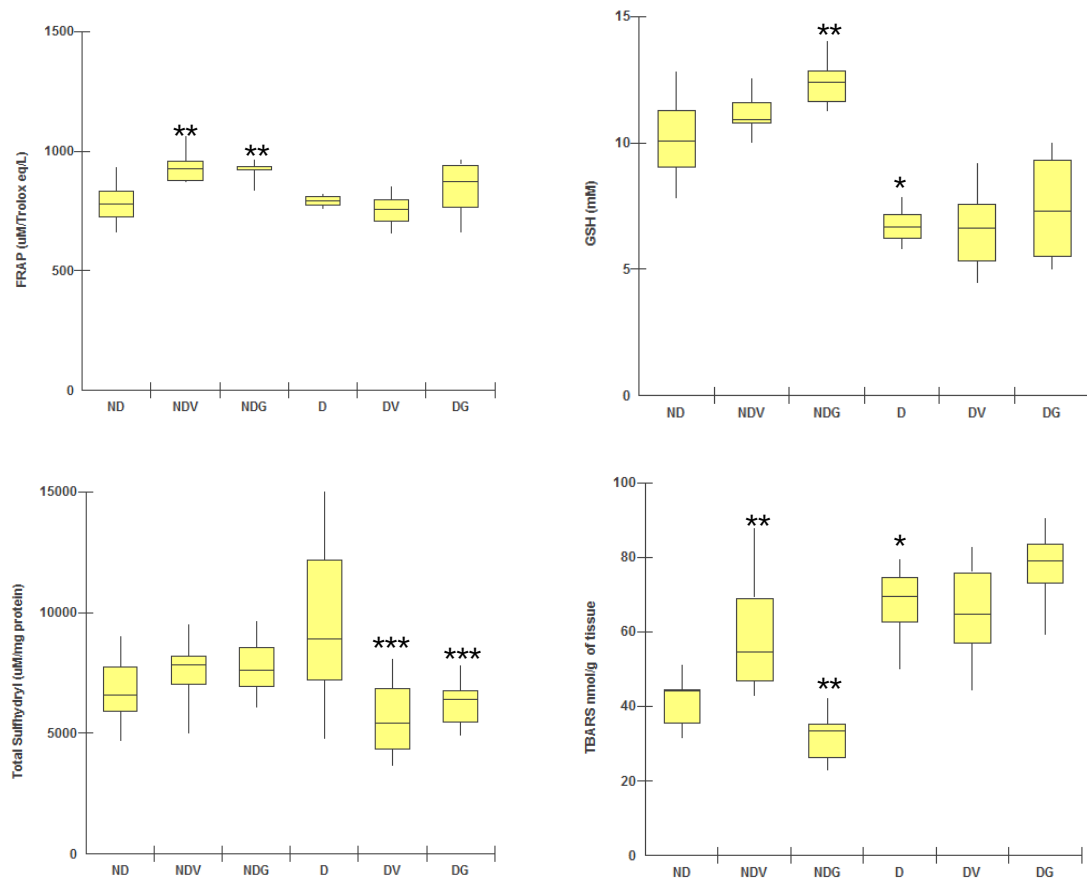


Figure 6: Effects of *V. rufa* on FRAP, GSH, sulfhydryl and TBARS levels in pancreas of non diabetic and diabetic rats for 43 days. Values are given median (interquartile range) for 4 rats in each group.

* $p < 0.05$ compare D vs ND;

** $p < 0.05$ compare with control non diabetic (ND)

*** $p < 0.05$ compare with control diabetic (D)

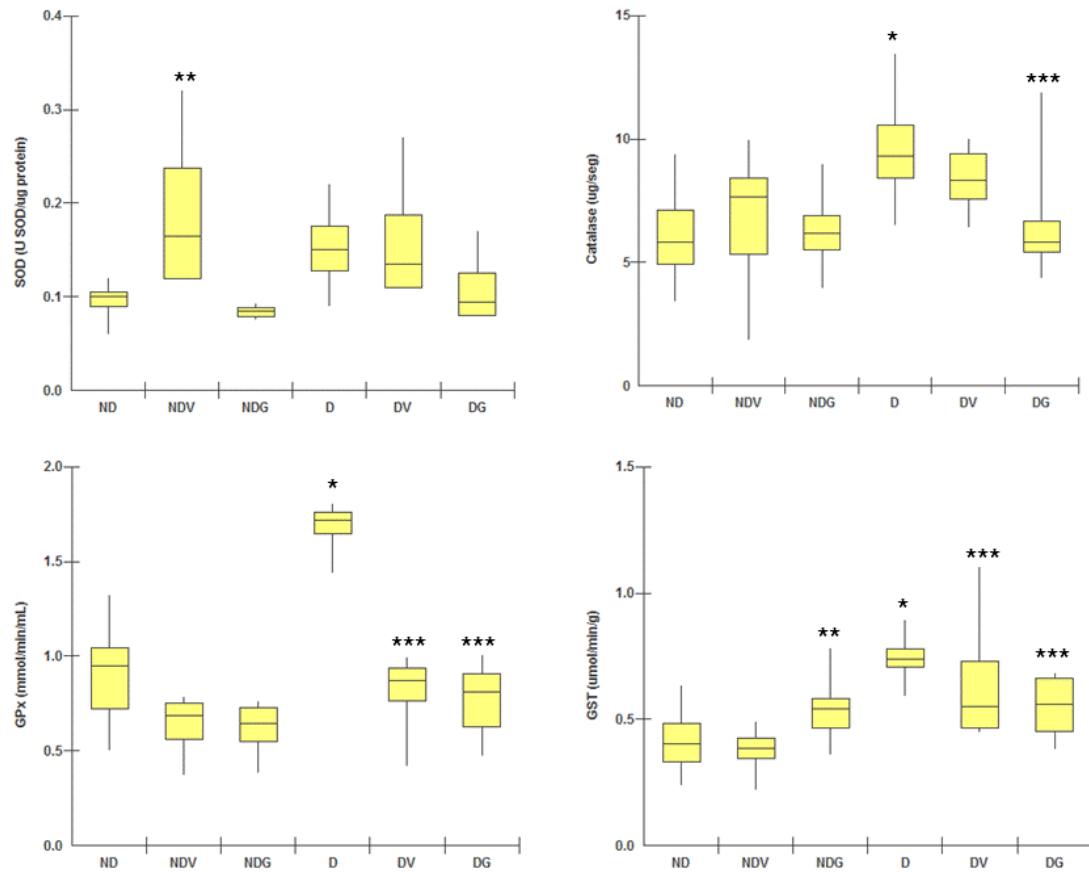


Figure 7: Effects of *V. rufa* on SOD, CAT, GPx and GST activities in pancreas of non diabetic and diabetic rats for 43 days. Values are given median (interquartile range) for 4 rats in each group.

* $p < 0.05$ compare D vs ND;

** $p < 0.05$ compare with control non diabetic (ND)

*** $p < 0.05$ compare with control diabetic (D)

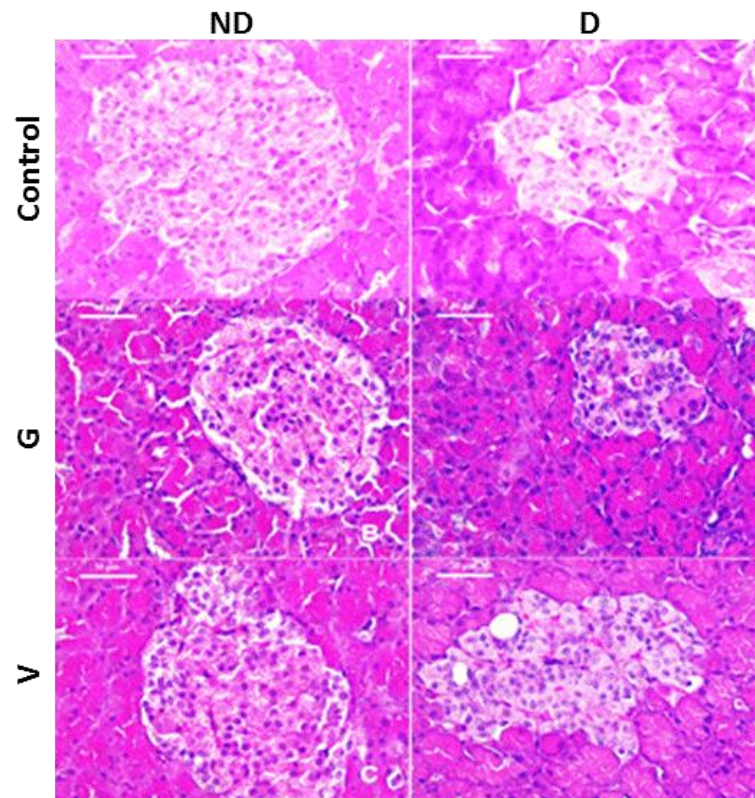


Figure 8: Paraffin sections of pancreas of non diabetic (ND) and diabetic (D) rats treated with *V. rufa* (V) and controls (Water and glibenclamide- G). Phloxine-hematoxin (10x).

Table 2: Number, diameter and percentage of islets in relation to the slice area in the pancreas tissue of non diabetic and diabetic rats.

	ND	NDV	NDG	D	DV	DG
Number of islets	45.50 (40.0-58.0)	48.00 (40.0-53.0)	38.00 (31.0-56.0)	21.0 (15.5-29.5)*	17.5 (15.0-19.0)	24.5 (14.0-27.5)
Percentage of islets in relation to the slice area	1.11 (0.9-2.3)	1.51 (1.2-5.9)	1.95 (1.10-2.6)	0.51 (0.3-0.6)*	0.51 (0.2-0.6)	0.38 (0.2-1.3)

Data are expressed as median (interquartile range), n=4.

* $p < 0.05$ compare D vs. ND

** $p < 0.001$ compared with ND

*** $p < 0.001$ compared with D

Capítulo 3

Capítulo 3:

**Artigo será enviado para Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition
(Impact factor 1.609)**

**Phaseolamin, an alpha-amylase inhibitor, improves antioxidant
capacity in the pancreas of the streptozotocin-induced diabetic rats**

Gouveia, N.M.¹; Bernardino Neto, M.¹; Mundim, A.V.²; Calábria, L.K.^{1,&};
Espindola, F.S.^{1,*}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, ²Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author:

Foued S. Espindola

Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica.

Av. Pará 1720

38400-902, Uberlândia, MG, Brasil.

Phone: 55 34 3218 2477.

e-mail address: fsespindola@gmail.com

& Present address: Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus avançado de Governador Valadares.

Abstract

An alternative to reduce hyperglycemia and the effects caused by oxidative stress would be the alpha-amylase inhibitors, because can reduce hyperglycemia by delaying carbohydrate digestion. Phaseolamin to inhibit the activity of alpha-amylases, therefore, in this study, we evaluated the potential antioxidant of commercial phaseolamin of in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. The phaseolamin extract decreased the *in vitro* alpha-amylase activity by 88%, at concentrations of 200 U/mL and 1000 U/mL. Experimental diabetes was induced by a single dose of streptozotocin (40 mg/kg) injected into the penile vein. The animals received through oral gavage daily: water (D control group), phaseolamin (500 mg/kg) (DP group) and acarbose (25 mg/kg) as a control drug (DA group). DP group did not showed reduction in glycemia and body weight compared to controls. However, DP and NDP groups displayed lower glycemic levels when compared before and after the treatment. DP rats significantly increased serum uric acid and urea levels compared to D rats. NDP similar to the NDA rats showed increased urea and ALT levels, while only NDP decreased triglyceride and VLDL level when compared to ND rats. The DP groups significantly decrease GPx and GST activities when compared to D groups. The treated NDP group showed increased of the GPx and GST activity. In conclusion, commercial phaseolamin tended to decrease the glycemic levels probably by inhibition of the alpha amylase (as shown *in vitro* data), alleviating GPx and GST in pancreatic tissue of STZ-diabetic rats. Furthermore, the release of uric acid in plasma may be contributed for antioxidant activity of the phaseolamin in pancreas.

Keywords: diabetes, oxidative stress, pancreas, phaseolamin, rats.

Introduction

Diabetes is characterized by hyperglycemia and insufficient insulin production or action and has been associated with damage and dysfunction of several body tissues, altering quality of life and longevity [1]. Oxidative stress has a central role in the pathogenesis and development of the complications of diabetes. Disease progression is usually accompanied by increased production of reactive oxygen species (ROS) and/or reduction in the efficiency of antioxidant defense systems [2].

Chronic hyperglycemia impairs β -cell function and insulin sensitivity, a phenomenon known as glucotoxicity [3]. The pancreatic β -cell is highly susceptible to oxidative stress because they have very low expressions and activities of antioxidative enzymes [4]. An alternative to reduce hyperglycemia and the effects caused by oxidative stress would be the alpha-amylase inhibitors, because can reduce hyperglycemia by delaying carbohydrate digestion (starch blockers) and thereby decreasing intestinal glucose absorption. This type of inhibitor can be used to treat diabetes mellitus type 2 [5-8].

In 1995, Roman-Ramos, [9] showed that the aqueous extract of *Phaseolus vulgaris* pods possessed antihyperglycemic activity. Phaseolamin is a glycoprotein extracted from seed of *P. vulgaris* that inhibit the activity of alpha-amylases. Phaseolamin has been marketed and prescribed to reduce glycemia and body weight in humans by blocking of carbohydrates digestion, although there are contradictions regarding its effectiveness. To our knowledge, no biochemical investigations had been carried with amylase inhibitors for reduce oxidative stress in pancreas of experimental diabetic rats. Thus, we evaluated the possible effect(s) antioxidant of phaseolamin in pancreas of the STZ-treated diabetic rats.

Material and methods

Obtaining and preparation of phaseolamin

Phaseolamin was acquired from DEG import of chemicals Ltda, São Paulo, Brazil. The product is originated from China (lot TYW110112). According to the manufacturer's certificate of analysis the product has more than 3.765 U/g of amylase inhibitory activity. The commercial phaseolamin sample was solubilized at a final concentration of 38 U/mL, 200 U/mL and 1000 U/mL MilliQ water for 3 h with stirring at 20 °C. The extract was centrifuged (1,000 x *g* for 15 min) at 4°C, and the resulting supernatant was used in the subsequent assays.

Protein analysis

The protein concentration was determined by Bradford, [11] method using bovine serum albumin as standard. Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) with a 5-22% gradient gel was performed as previously described [12]. The protein bands were stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Inhibition of human alpha-amylase *in vitro*

The commercial phaseolamin extract was analyzed for inhibition of alpha-amylase activity with the GALG2CNP substrate and a saliva fraction enriched with alpha-amylase (HSA-f) by GALG2CNP method with modifications (Salimetrics, Canada, USA). Briefly, human saliva samples were collected from five individuals and stored at -20 °C for 48 h. The samples were thawed and centrifuged at 12,000 x *g* for 10 min at 20 °C. The supernatant was fractionated in a Q-Sepharose fast flow (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweeden) column with a 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, and 10 mM EGTA buffer. The volume excluded from the Q-Sepharose column was dialyzed three times in ammonium bicarbonate buffer (pH 7.0), lyophilized, and solubilized in PBS at pH 7.2. This fraction is referred to as the “HSA-f fraction”. The assay was conducted in microplates with the 2-chloro-4-nitrophenyl-4-β-D-galactopyranosylmaltoside (GalG2CNP) substrate (Sorachim S. A., Lausanne, Switzerland). The enriched alpha-amylase human saliva fraction (HSA-f) was diluted 100-fold in 50 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer

(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) containing 5 mM CaCl₂, 140mM potassium thiocyanate and 300 mM NaCl (pH 6.0). The sample was pre-incubated for 30 minutes with HSA-f (1:10 v/v). The reaction was initiated by the addition of 320 µL of 12 mM substrate, and the increase in absorbance (i.e., CNP release) was measured at 37 °C every minute at a wavelength of 405 nm (Microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). This assay was also carried out with acarbose positive control, 10 mg/mL (provided by EMS S/A, São Paulo, Brazil). All of the assays were performed in duplicate. To calculate the alpha-amylase activity, the following equation was used: $[(\sum \Delta \text{Abs}/\text{min} \times v \times \text{df})/(\text{mma} \times \text{sv} \times \text{lp})]$ = U/mL of alpha-amylase activity, where $\sum \Delta \text{Abs}/\text{min}$ is the sum of the absorbance difference per minute $((A_3-A_2)+(A_2-A_1))/2$; A is absorbance; 1, 2 and 3= minutes; (v) - is the total reaction volume; (df) - is the dilution factor of the saliva sample; (mma) - is the millimolar absorption of 2-chloro-p-nitrophenol; (sv) - is the sample volume; and (lp) - is the length of the light path.

Animals

Male Wistar rats that weighed 200-220 g were used for the animal studies and housed under standard conditions (22±1°C, humidity 60±5% and 12 h light: 12 h dark cycle). Animals were fed with commercial pellet diet (65.82% carbohydrate, 5.36% fibre, 21.0% protein and 4.96% fat) (Bio base, SC, Brazil) and received water *ad libitum*. All the procedures for the handling, use, and euthanasia of the animals were approved by the Ethics Committee in Animal Research of the Federal University of Uberlandia, Brazil (CEUA/UFU 060/10).

Induction of diabetes mellitus

The rats were allowed to acclimate to their environment for one week and were subsequently fasted for 24 h. The animals were anesthetized with xylazine/ketamine (1:1 v/v) intraperitoneally, and 40 mg/kg streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich) was freshly dissolved in 0.01 M citrate buffer (pH 4.5, injection volume of 2 mL/kg) and injected into the penile vein in rats. The animals were fasted for another 90 min after the injection. Ten days after the STZ injection, rats that had a fasting blood glucose level greater than 250 mg/dl were used for subsequent experiments.

Experimental design

The animals were divided into 6 groups of 10 animals each received the following treatments:

- (i) non diabetic controls (ND), the animals received 1 mL of distilled water for 43 days;
- (ii) non diabetic group treated with phaseolamin (1882 U/kg) (NDP) for 43 days;
- (iii) non diabetic group treated with acarbose (25 mg/kg) (NDA) for 43 days;
- (iv) control diabetic (D), the animals received 1 mL of distilled water for 43 days;
- (iv) diabetic group treated with phaseolamin (1882 U/kg) (DP) for 43 days;
- (v) diabetic group treated with acarbose (25 mg/kg) (DA) for 43 days;

The phaseolamin was diluted in distilled water and administered in the afternoon by gavage for 43 days. Body weight and blood glucose levels were monitored. Blood glucose was monitored using reactive strips for blood glucose (Contour Glucose Test Strip) (Bayer, Mishawaka, USA). At the end of the experiment the animals were fasted for 12 hours after anesthesia and blood samples were collected from the hepatic portal vein. Pancreas were dissected immediately, washed in saline (NaCl 0.9%) were kept in liquid nitrogen and stored at -80 °C for biochemical analyzes and biomarkers of oxidative stress.

Serum biochemical measurements

The total cholesterol, triglyceride, urea, creatinine, alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (gamma-GT), aspartate amino transferase (AST), and alanine amino transferase (ALT), HDL cholesterol, uric acid levels were determined from a serum sample. All of the parameters were measured in a Clinical Analysis Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Uberlandia with ChemWell Automated Analyzer equipment (Awareness Technology Inc., Florida, USA) via colorimetric methods using commercial kits (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brazil).

Tissue preparation

Four pancreas of each group were homogenized on ice in ten volumes of homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM dithiothreitol, 1mM benzamidine, 0.5 mM fenilmetano sulfonyl fluoride, 0.5 mM aprotinin, 0.1 mM pefabloc). The homogenate was centrifuged at 10.000 x *g* for 5 min at 4 °C. Proteins were measured by the Bradford method.

Biomarkers of oxidative stress in pancreas

The total antioxidant capacity (FRAP) was evaluated using the test Benzie and Strain, [13]. In this test the antioxidant present in the sample reduced Fe^{+2} to Fe^{+3} which is chelated by 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), where the blue color is monitored at 593 nm. Lipid peroxidation in the pancreatic tissue was estimated colorimetrically by the method of Hermes-Lima et al. [14], where it is determined the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results were expressed in nmol.g^{-1} of the tissue. Sulfhydryl levels were determined using 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), as described by Faureand and Lafond, [15]. The glutathione S-transferase was determined by the method of [16]. The decrease in absorbance was measured at 340 nm. The amount of reduced glutathione (GSH) concentration was determined by the method of Beutler et al. [17], in combination with DTNB homogenate acid based on the reaction of glutathione with the DTNB to form a thiol (TNB) of yellow color.

Activity of antioxidant enzymes

Catalase activity was determined by monitoring decomposition of hydrogen peroxide at 240 nm [18]. The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined by inhibition of adenocromo during the oxidation of adrenaline. The results were expressed as U SOD/mg of protein [19]. The activity of glutathione peroxidase (GPx) was quantified by the oxidation of NADPH in the presence of glutathione reductase (GR), measured at 340 nm and expressed in $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ [20].

Statistical analysis

Data was reported as medians (interquartile range). The groups were compared by the Kruskal-Wallis test for differences in more than two populations followed by the Student-Newman-Keuls post-test. The comparisons between two independent groups were made used Mann–Whitney test, also known as experimental and control. For all tests, $p < 0.05$ was considered statistically significant. For statistical analysis we used the BioStat version 5.0 statistical software.

Results

***In vitro* inhibition of human alpha-amylase**

The phaseolamin extract decreased the *in vitro* alpha-amylase activity by 88%, at concentrations of 200 U/mL and 1000 U/mL, while at 38 inhibited less than 10% of HSA-f activity. Acarbose, positive control, inhibited 100% of HSA-f activity. The final concentration used in the assay was 0.19 U to 38 U/mL, 1 U to 200 U/mL and 5 U to 1000 U/mL. The measurement of the protein the samples showed the following concentrations, 0.16, 1.56 and 1.56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ for 38, 200 and 1000 U/mL, respectively.

Effect of the phaseolamin on blood glucose and body weight

The blood glucose and body weight of diabetic animals that received phaseolamin extract (1882 U /kg) during 43 days are listed in Figure 1. The DP group received about 442-410 U of the amylase inhibitor during the treatment. There was no significant decrease in the body weight of treated experimental group for 43 days of administration of the phaseolamin or acarbose. There was a progressive and significant increase in the body weight of ND whereas D showed a decrease in body weight. A significant increase in blood glucose level was observed in D rats compared with ND rats. After 43 days of the experiment DP tended to decrease blood glucose levels, but was not significant compared with D group, while the DA group not shows any effect. However, at the end of the experiment DP tended to decrease blood glucose levels, but was not significant compared with D group. The blood glucose levels, when compared

before and after treatment, to the groups DP show lower glycemic levels, about 33%, while D group increased glycemic levels by 34%.

Effect of phaseolamin on serum biochemical parameters

The effects of phaseolamin on biochemical parameters in non-diabetic and diabetic rats are listed in Table 1. DP rats significantly increased serum uric acid ($p < 0.01$), and urea ($p < 0.01$) levels compared to D rats. DA rats decreased, alanine aminotransferase (ALT) ($p < 0.001$) and HDL-C levels. NDP displayed similar values compared to the NDA that rats showed increased urea ($p < 0.01$) and ALT ($p < 0.05$) levels while only NDP decreased triglyceride ($p < 0.01$) and VLDL level when compared to ND rats.

Effect of phaseolamin on biomarkers of oxidative stress in pancreas

The effects of phaseolamin on biomarkers of oxidative stress in non-diabetic and diabetic rats are listed in Figure 2. In diabetic pancreas homogenates we found increased TBARS level, and a decreased GSH level. The DP group did not change GSH, sulfhydryl, TBARS and FRAP levels. Acarbose increased TBARS ($p < 0.01$) levels in D group. The treated NDA group showed increased FRAP ($p < 0.01$) level.

Effect of phaseolamin on activity of antioxidant enzymes in pancreas

The effects of phaseolamin on activity of antioxidant enzymes in non-diabetic and diabetic rats are listed in Figure 3. In diabetic pancreas homogenates we found increased catalase, GPx and GST activities. The DP group did not change catalase activity. However, significantly decrease GPx ($p < 0.06$) and GST ($p < 0.001$) activities when compared to D group. Similarly acarbose reduced GPx ($p < 0.001$) and GST ($p < 0.01$) activity. The treated NDP group showed increased of the GPx ($p < 0.01$) and GST ($p < 0.01$) activity. The treated NDA group showed decreased GST ($p < 0.01$) activities.

Discussion

The untreated diabetic rats had higher blood glucose levels and lower body weight compared to non-diabetic controls. Interestingly, the DP group tended improved glucose levels than compared D group; moreover DP group reduced glucose levels compared after and before treatment. The control of blood glucose levels is probably due to the inhibition of the α -amylase in treated diabetic rats with phaseolamin. This fact is proved by results of the *in vitro* assay. Pereira et al. [21] showed a tendency of white bean flour in reducing blood glucose, however was not significant. Previous studies in diabetic and non-diabetic rats that were treated chronically with phaseolamin have corroborated with our results [22-24]. In contrast the acarbose, a standard drug did not reduce the glycemic levels.

The diabetic rats showed an increase of urea, AST, ALT, ALP, HDL-C and LDL levels compared non diabetic rats. Elevation of the serum urea and creatinine, as significant markers, are related to renal dysfunction in diabetic hyperglycemia [25]. Serum enzymes including ALT and ALT are used in the evaluation of hepatic disorders. An increase in these enzyme activities reflects active liver damage [26]. The liver is necrotized in streptozotocin-induced diabetic rats [27]. Therefore, increased in the activities of AST, ALT, ALP and gamma-GT in serum may be mainly due to the leakage of these enzymes from the liver cytosol into the blood [28]. The measurement of blood lipids and liver enzymes provides important parameters in determining the safety of functional ingredients or final products derived from plants tested for toxicity [29]. The other views may be explicated through of the reduction in protein catabolism decrease hepatic uptake of amino acids and, consequently, the serum levels of AST and ALT, as seen in treated diabetic animals. Thus, the phaseolamin may cause liver damage in healthy animals by increase ALT levels.

Our data showed that uric acid levels tended decreased in diabetic rats. Uric acid is an effective antioxidant in its ability to scavenge hydroxyl radicals, hypochlorous acid, and peroxynitrite [30]. Recent anti-oxidant biochemistry studies show uric acid is one of the most effective free radical scavengers. Uric acid has a potent defense function against a wide variety of the cellular oxidative damage of lipids, proteins and nuclei acids [31]. Furthermore, uric acid

is an efficient iron chelator [30], which certainly can play a major role in the overall suppressive action against oxidative stress [32]. Increased xanthine oxidase activity generates oxygen radicals and uric acid from xanthine; xanthine is formed from the degradation of ATP and reoxygenation [33]. In this study, increased serum uric acid levels in DP group can be result of the its potent effect free radical scavenger, inhibiting lipid peroxidation and occuring in several tissues. In pancreas, although phaseolamin tended decreased TBARS levels, no was significantly.

The treatment with phaseolamin did not affect the total cholesterol and triglyceride levels in diabetic rats. This suggests that the mode of action of phaseolamin does not affect lipid metabolism in diabetic rats. Similar results were demonstrated by Pereira et al. [21] with administration of white bean flour in rats for 21 days. A previous study by our group also showed that diabetic rats treated with a commercial phaseolamin sample did not alter the lipid profile [34]. According to Gouveia et al. [35] acarbose reduces cardiovascular risk in subject with metabolic syndrome. However, in our study acarbose decreasing HDL-C and did not altered lipid profile.

To our knowledge, no biochemical investigations had been carried out with amylase inhibitors for reducing oxidative stress in pancreas of experimental diabetic rats. Our results showed that the administration of phaseolamin and acarbose decreased significantly GPx and GST activity in diabetic rats. Phaseolamin may have a detoxifying effect because it reduced the high GPx and GST levels in diabetic rats. Moreover, phaseolamin did not change SOD and CAT levels, because no increased reactive oxygen species, was found probably due to the releasing of uric acid in plasma. In compensation, the administration of phaseolamin extract increased significantly GPx and GST activity in non diabetic rats and reduced triglycerides levels and VLDL. Thus, in healthy condition phaseolamin does not cause lipid peroxidation.

Similar our date, Ardestani et al. [36] showed decrease of GSH levels in the pancreas of diabetic rats compared to non diabetic rats. GSH is a major intracellular redox buffer that participates in the cellular defense system against oxidative stress by scavenging free radicals and reactive oxygen intermediates [37]. Thus, the decrease in pancreatic GSH levels in the diabetic rats might reflect a direct reaction between GSH and the free radicals generated by

hyperglycemia in diabetes mellitus. Venkateswaran and Pari, [38] showed that administration of *P. vulgaris* pod extract increased the content of GSH in the liver and kidneys of diabetic rats. In contrast, we did not observed changes in pancreas of treated diabetic rats.

In conclusion, commercial phaseolamin tended to decrease the glycemic levels probably by inhibition of the α -amylase, alleviating GPx and GST activities in pancreatic tissue of STZ-diabetic rats. Furthermore, the release of uric acid in plasma may be contributed for antioxidant activity of the phaseolamin in pancreas.

Acknowledgments

This work was supported by the Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)-Brazil (grant number APQ-01271-10 to FSE). This work also received support by fellowship to NMG, LKC and MBN (CAPES), and by Rede Fitocerrado which is a non-governmental organization based in Uberlândia. We thank the School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia and lab technician Felipe Cezar Gonçalves for his help in biochemical analyses.

References

1. Khan, A., G. Zaman, and R.A. Anderson, *Bay leaves improve glucose and lipid profile of people with type 2 diabetes*. J Clin Biochem Nutr, 2009. **44**(1): p. 52-6.
2. Baynes, J.W., *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. Diabetes, 1991. **40**(4): p. 405-12.
3. Kaiser, N., G. Leibowitz, and R. Nesher, *Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2003. **16**(1): p. 5-22.
4. Grankvist, K., S.L. Marklund, and I.B. Taljedal, *CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse*. Biochem J, 1981. **199**(2): p. 393-8.
5. Ali, H., P.J. Houghton, and A. Soumyanath, *alpha-Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus*. J Ethnopharmacol, 2006. **107**(3): p. 449-55.
6. Gad, M.Z., et al., *Biochemical study of the anti-diabetic action of the Egyptian plants fenugreek and balanites*. Mol Cell Biochem, 2006. **281**(1-2): p. 173-83.
7. Mosca, M., et al., *Determination of alpha-amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (Phaseolus vulgaris) in dietary supplements by HPAEC-PAD*. Anal Chim Acta, 2008. **617**(1-2): p. 192-5.

8. Oneda, H., S. Lee, and K. Inouye, *Inhibitory effect of 0.19 alpha-amylase inhibitor from wheat kernel on the activity of porcine pancreas alpha-amylase and its thermal stability*. J Biochem, 2004. **135**(3): p. 421-7.
9. Roman-Ramos, R., J.L. Flores-Saenz, and F.J. Alarcon-Aguilar, *Anti-hyperglycemic effect of some edible plants*. J Ethnopharmacol, 1995. **48**(1): p. 25-32.
10. Pari, L. and S. Venkateswaran, *Effect of an aqueous extract of Phaseolus vulgaris on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucose metabolism in experimental diabetes*. Pharmazie, 2003. **58**(12): p. 916-9.
11. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
12. Laemmli, U.K. and M. Favre, *Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events*. J Mol Biol, 1973. **80**(4): p. 575-99.
13. Benzie, I.F. and J.J. Strain, *Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. Methods Enzymol, 1999. **299**: p. 15-27.
14. Hermes-Lima, M., W.G. Willmore, and K.B. Storey, *Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(3): p. 271-80.
15. Faureand, P.L., J.L., *Measurement of plasma sulphydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation*. 1995: Birkhäuser, Basel. p. 237-249.
16. Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby, *Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation*. J Biol Chem, 1974. **249**(22): p. 7130-9.
17. Beutler, E., O. Duron, and B.M. Kelly, *Improved method for the determination of blood glutathione*. J Lab Clin Med, 1963. **61**: p. 882-8.
18. Aebi, H., H. Suter, and R.N. Feinstein, *Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice*. Biochem Genet, 1968. **2**(3): p. 245-51.
19. Misra, H.P. and I. Fridovich, *The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1972. **247**(10): p. 3170-5.
20. Flohe, L. and W.A. Gunzler, *Assays of glutathione peroxidase*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 114-21.
21. Pereira, L.L.S., et al., *White Bean Flour (Phaseolus Vulgaris): Therapeutic and Toxicological Research in Wistar Rats* Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2012. **2**.
22. Kotaru, M., et al., *In vivo action of alpha-amylase inhibitor from cranberry bean (Phaseolus vulgaris) in rat small intestine*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1989. **35**(6): p. 579-88.
23. Tormo, M.A., et al., *Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (Phaseolus vulgaris) in Wistar rats*. Br J Nutr, 2004. **92**(5): p. 785-90.

24. Tormo, M.A., et al., *White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats*. Br J Nutr, 2006. **96**(3): p. 539-44.
25. Almdal, T.P. and H. Vilstrup, *Strict insulin therapy normalises organ nitrogen contents and the capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats*. Diabetologia, 1988. **31**(2): p. 114-8.
26. Fortson, W.C., et al., *Marked elevation of serum transaminase activity associated with extrahepatic biliary tract disease*. J Clin Gastroenterol, 1985. **7**(6): p. 502-5.
27. Ohaeri, O.C., *Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats*. Biosci Rep, 2001. **21**(1): p. 19-24.
28. Concepcion Navarro, M., et al., *Free radical scavenger and antihepatotoxic activity of Rosmarinus tomentosus*. Planta Med, 1993. **59**(4): p. 312-4.
29. Patel, C., et al., *Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(8): p. 2728-35.
30. Tubaro, E., et al., *Xanthine oxidase increase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations*. Biochem Pharmacol, 1980. **29**(13): p. 1945-8.
31. Ames, B.N., et al., *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 6858-62.
32. Davies, K.J., et al., *Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid*. Biochem J, 1986. **235**(3): p. 747-54.
33. McCord, J.M., R.S. Roy, and S.W. Schaffer, *Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase*. Adv Myocardiol, 1985. **5**: p. 183-9.
34. Gouveia, N.M.A., F.V.; Furtado, F.B; Scherer, D.L.; Mundim, A.V.; Espindola, F.S., *Commercial phaseolamin treatment reduces glycemia and serum biochemical parameters instreptozotocin-induced diabetic rats*. Nutrition Research, 2012. **x**(xx): p. xx.
35. Yamagishi, S., et al., *Clinical utility of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor in cardiometabolic disorders*. Curr Drug Metab, 2009. **10**(2): p. 159-63.
36. Ardestani, A., R. Yazdanparast, and S. Jamshidi, *Therapeutic effects of Teucrium polium extract on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats*. J Med Food, 2008. **11**(3): p. 525-32.
37. Wu, G., et al., *Glutathione metabolism and its implications for health*. J Nutr, 2004. **134**(3): p. 489-92.
38. Venkateswaran, S., L. Pari, and G. Saravanan, *Effect of Phaseolus vulgaris on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes*. J Med Food, 2002. **5**(2): p. 97-103.

Body weight	Day 0	Day 21	Day 43	Body weight gain (g/rat)
ND	264.4±1.5	336.6±26.3	361.4±45.2	97
D	229.8±35.6*	226.8±17.3*	218.6±23.2*	-11.2*
DP	235.4±36.8	215.2±38.4	218.8±34.6	-16.6
DA	216.8±23.2	224.0±11.9	220.8±18.0	4

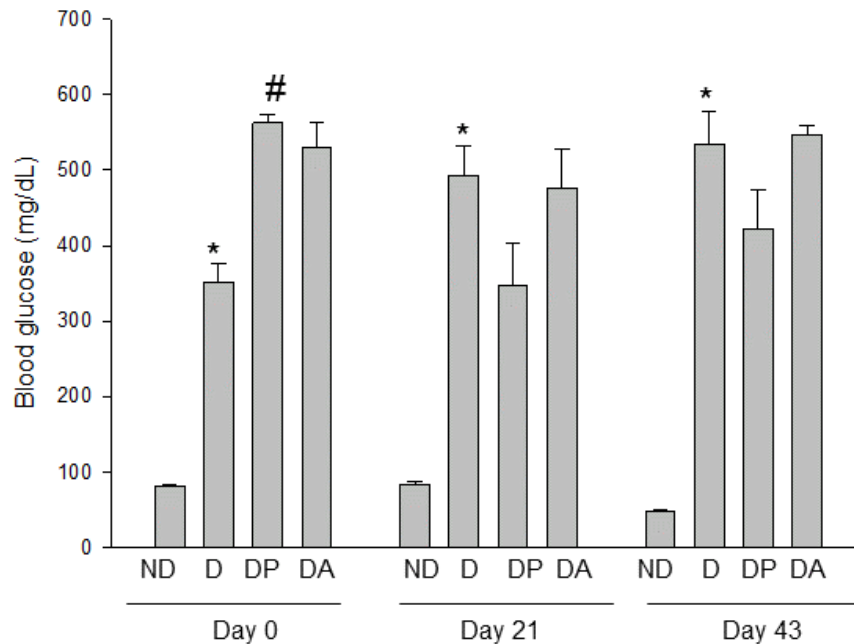


Figure 1: Changes in serum blood glucose and body weight in diabetic rats after daily administration of water (ND and D), 1882 U/kg of phaseolamin (DP), or 25 mg/kg of acarbose (DA) after 21 and 43 days of treatment. The data represent the mean $\pm$ S.E.M for five rats. Values are statistically significant at * $p < 0.01$, compare with control non diabetic (ND); # $p < 0.01$ compare with control diabetic (D).

Table 1: The total cholesterol, triglyceride, creatinine, urea, alkaline phosphatase (ALP), gamma GT, aspartate amino transferase (AST), and alanine amino transferase (ALT) levels of non-diabetic (ND) and diabetic (D) rats after daily administration of water, 1882 U/kg of commercial phaseolamin (P), or 25 mg/kg of acarbose (A) after 43 days of treatment.

Parameters	ND	NDP	NDA	D	DP	DA
Cholesterol (mg/dL)	45.70 (12.10)	39.75 (19.42)	53.60 (21.65)	53.80 (19.92)	59.80 (18.90)	48.25 (9.50)
Triglycerides (mg/dL)	73.50 (80.17)	25.25 (38.55)**	59.00 (34.92)	112.70 (84.70)	157.40 (116.60)	80.15 (50.50)
HDL-C	17.55 (5.47)	18.25 (3.85)	19.80 (5.35)	23.50 (3.65)*	22.00 (7.70)	17.65 (3.05)***
VLDL	14.70 (16.03)	5.05 (7.71)**	11.80 (6.98)	22.54 (16.94)	31.48 (23.32)	16.03 (10.01)
LDL	14.42 (8.12)	15.67 (8.92)	19.22 (18.64)	12.12 (5.29)*	10.62 (7.30)	10.26 (17.68)
Creatinine (mg/dL)	0.63 (0.10)	0.58 (0.22)	0.56 (0.27)	0.50 (0.11)	0.64 (0.24)	0.62 (0.21)
Urea (mg/dL)	26.70 (12.72)	71.30 (10.35)**	56.70 (8.60)**	67.20 (20.60)*	89.20 (31.50)***	62.35 (20.42)
Acid uric (mg/dL)	1.41 (4.33)	0.95 (0.51)	1.30 (1.05)	0.93 (1.05)	7.56 (6.75)***	1.30 (0.66)
ALP (U/L)	208.05 (71.47)	154.05 (93.35)	187.55 (63.30)	1330.75 (461.07)*	1313.00 (441.60)	897.90 (552.92)
γ-GT (U/L)	8.00 (8.87)	7.10 (6.35)	5.20 (4.72)	11.25 (33.7)	10.90 (68.80)	16.25 (39.52)
AST (U/L)	90.50 (17.50)	113.50 (55.50)	77.50 (26.50)	490.00 (520.00)*	320.00 (650.00)	235.00 (65.00)
ALT (U/L)	86.00 (30.5)	101.50 (15.00)**	106.00 (15.00)**	345.00 (307.50)*	230.00 (350.00)	150.00 (57.50)***

Data are expressed as median (IQR – interquartile range), n=10. * $p < 0.05$ compare D vs ND; ** $p < 0.05$ compare with control non diabetic (ND); *** $p < 0.05$ compare with control diabetic (D).

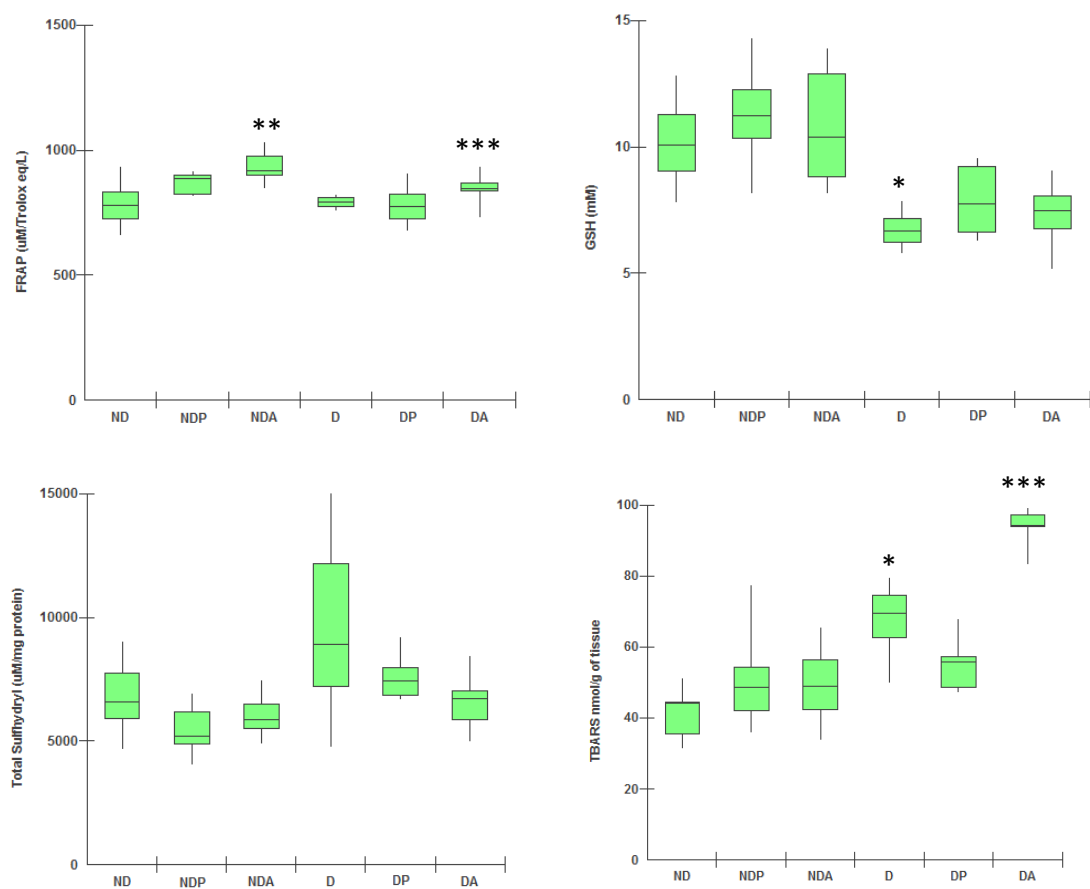


Figure 2: Effects of commercial phaseolamin on FRAP, GSH, sulfhydryl and TBARS levels in pancreas of non diabetic and diabetic rats for 43 days. Values are given median (interquartile range) for 4 rats in each group.

* $p < 0.05$ compare D vs ND;

** $p < 0.05$ compare with control non diabetic (ND)

*** $p < 0.05$ compare with control diabetic (D)

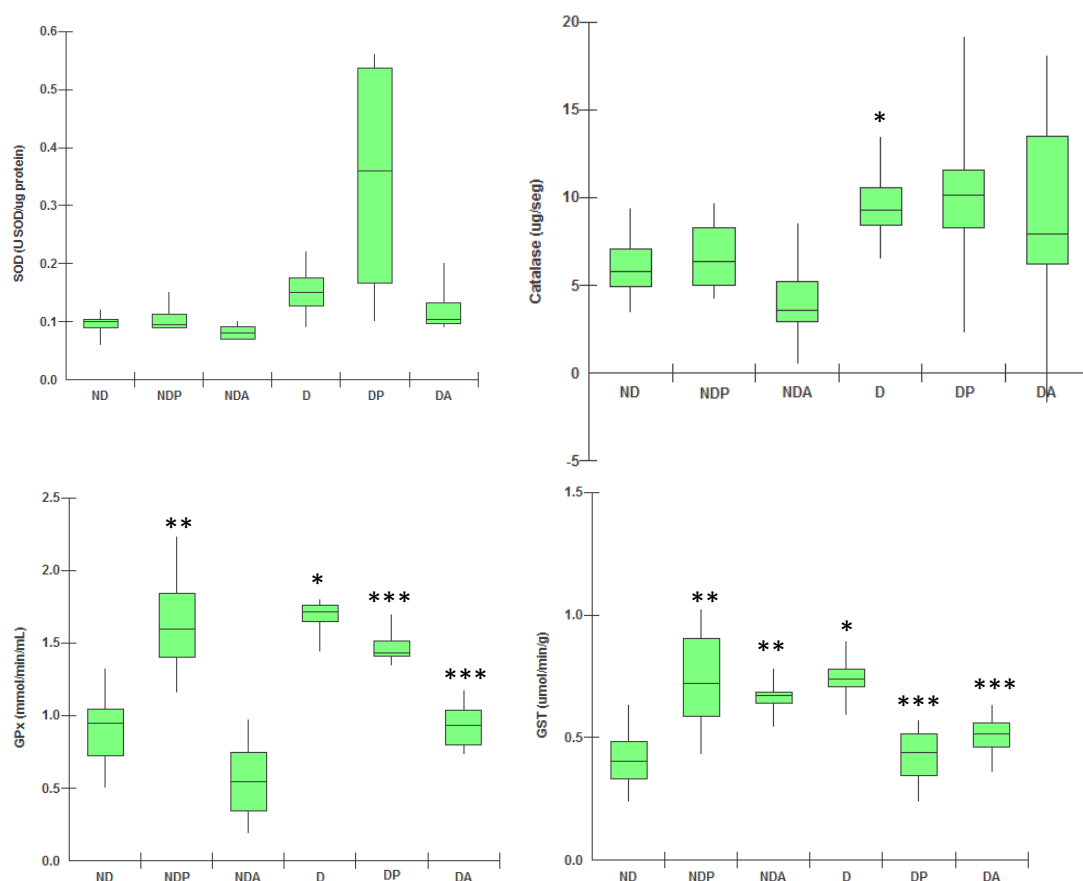


Figure 3: Effects of commercial phaseolamin on SOD, CAT, GPx and GST activities in pancreas of non diabetic and diabetic rats for 43 days. Values are given median (interquartile range) for 4 rats in each group.

* $p < 0.05$ compare D vs ND;

** $p < 0.05$ compare with control non diabetic (ND)

*** $p < 0.05$ compare with control diabetic (D)

Capítulo 4

Integração Universidade e Sociedade: atividades de ensino, pesquisa e extensão com plantas medicinais

Neire Moura de Gouveia^{1,2}; Vilma Lucia Moura²; Foued Salmen Espindola^{1,2,3*}

¹Instituto de Genética e Bioquímica; ²Rede FitoCerrado; ³Centro Rede FitoCerrado, Pro-Reitoria de Extensão, Assuntos Estudantis e Cultura Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

Introdução

Universidade versus Sociedade: união de saberes

A Extensão Universitária significa uma efetiva interação da Universidade com a sociedade, seja para se situar historicamente, para se identificar culturalmente ou para referenciar sua formação acadêmica. A indissociabilidade ensino – pesquisa – extensão reafirma a extensão como um processo acadêmico. Assim constitui-se a extensão na Universidade como um processo de formação de pessoas e de geração de conhecimento.

Despertar o interesse das comunidades para a utilização racional de plantas medicinais e da fitoterapia tem sido o objetivo da Rede Fitocerrado, uma organização que surgiu da interação dos professores da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e da Universidade de Uberaba (Uniube), a partir do primeiro Simpósio de Plantas Medicinais realizado em maio de 2004 na UFU e organizado pelo PET Biologia, sob a coordenação do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola (UFU/INGEB). Entre as propostas de atuação da Rede FitoCerrado compreende-se ações e projetos para resgatar a cultura popular, a tradição de nossos antepassados, que sabiam e conheciam todas as plantas medicinais, alimentos e frutos que estavam no seu quintal e com isso preservavam a biodiversidade que existe no Cerrado. É preciso valorizar esses recursos do cerrado por meio da educação. Assim, é fundamental chamar a atenção das crianças para a importância do cerrado, se fizermos isso, estaremos contribuindo para a preservação da sua fantástica biodiversidade.

Não é novidade para ninguém que essa biodiversidade contém uma riqueza imensa que pode ser utilizada em benefício da saúde humana. É por isso que a Rede

Fitocerrado revela, por meio de pesquisas em laboratório, o potencial que existe nessas plantas.

Nestes anos, produtores rurais, pessoas ligadas a indústrias e empresas, pesquisadores, professores, médicos e pessoas da comunidade que têm o interesse voltado para as plantas medicinais e a fitoterapia participaram de várias ações da Rede Fitocerrado. Desta forma, em dezembro de 2004, foi assinado o protocolo de intenções entre as instituições que integram a Rede como a UNIUBE, UFU, Prefeitura de Uberlândia, Embrapa, EPAMIG e algumas ONG's.

A Rede Fitocerrado é composta por várias instituições, organizações e cidadãos parceiros. O seu objetivo é centrado na produção e transmissão do conhecimento sobre os recursos com potencial econômico no Bioma Cerrado, conciliando o saber popular e o científico, para fins educacionais, de saúde, segurança alimentar e nutricional, no estímulo ao cultivo, processamento, comercialização e utilização das plantas medicinais, aromáticas e condimentares, na inovação tecnológica, e na sustentabilidade da cadeia produtiva das plantas medicinais e dos fitoterápicos.

Dentro do âmbito da Pró-Reitoria de Extensão, Assuntos Estudantis e Cultura (PROEX) da UFU criaram-se em 2008 as figuras dos Centros multidisciplinares e vinculados a PROEX. A criação do Centro Rede FitoCerrado ocorreu a princípio, por uma necessidade da UFU em definir ações e políticas estratégicas para participação na construção de um Centro de Referência em Plantas Medicinais, Nutracêuticas e Cosmecêuticas, em Fitoterapia e em Desenvolvimento Sustentável do Cerrado de acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006 que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria Grupo de Trabalho Interministerial) e de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (Portaria 971, de 03 de maio de 2006) no Triângulo Mineiro.

O processo de discussão para criação do Centro Rede FitoCerrado na UFU foi iniciado a partir da necessidade de institucionalização deste Centro, tendo em vista que a Rede Fitocerrado foi criada em 13 de dezembro de 2004 por meio de um protocolo de intenções. Desde então, a Rede Fitocerrado tem tido participação ativa em vários processos de estímulo a captação de recursos por meio de editais, realização de projetos de pesquisa e organização de eventos como simpósio, seminários, encontros e oficinas.

Portanto, com apoio de recursos de emenda parlamentar via PROEX a Rede Fitocerrado vem recebendo apoio Institucional nos últimos anos, e por isso, optou-se

pela criação do Centro Rede FitoCerrado vinculado à PROEX, com duas grandes linhas de intervenção: 1) promover a indissociabilidade das ações de ensino, pesquisa e extensão nos vários aspectos do Centro Rede FitoCerrado que contemplem o ensino de graduação e pós-graduação, a pesquisa, a inovação tecnológica, a saúde, a geração de renda e trabalho em relação as plantas medicinais, nutracêuticas e cosmecêuticas e a preservação e desenvolvimento sustentável do cerrado no âmbito da UFU, e 2) a participação e o envolvimento do Centro Rede FitoCerrado junto às demais organizações no âmbito do Bioma Cerrado e à comunidade externa.

O processo de formação de pessoas e de geração de conhecimento, reforça a ideia de soma entre saberes tradicionais e conhecimento acadêmico. Nota-se ainda a necessidade de estudos quanto a flora medicinal disponível. Pesquisas recentes demonstram que a chamada megabiodiversidade, representada por Austrália, Brasil, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, Malásia, México, Peru e Zaire está seriamente ameaçada, o que justificaria a utilização das plantas de forma sustentável para conservação e reparação das áreas degradadas (NODARE E GUERRA *apud* SIMÕES *et al.* 1999).

Com vista na cadeia produtiva de plantas medicinais, a formação e a capacitação profissional são de grande relevância para a garantia da qualidade e segurança das plantas medicinais cultivadas e utilizadas na fabricação de fitoterápicos, bem como da origem das matrizes das espécies cultivadas. Uma das diretrizes da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde é estabelecer estratégias de comunicação para divulgação do setor de plantas medicinais promovendo a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação destas plantas, incentivando o desenvolvimento de linhas de pesquisa e implantação de áreas de concentração relacionadas às plantas medicinais e aos fitoterápicos nos cursos de graduação e pós-graduação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A formação dos estudantes ocorre por meio de sua participação na Rede de relações que constitui a dinâmica social. Para um processo de aprendizagem efetivo e duradouro é necessário que existam propósitos definidos e atividade reflexiva dos alunos, que devem se mostrar interessados e empenhados em aprender. É no convívio social, através de práticas realizadas, que se criam as condições para o aparecimento da consciência. Essa interação entre professor-aluno está sendo discutida e repensada pelas Instituições de ensino e têm sido criados programas que visem a melhoria qualitativa e quantitativa da educação nas Universidades, tanto na graduação quanto na pós-graduação; e certamente a extensão passa por uma grande valorização como

parte integrante e indissociável deste processo, já que uma grande porcentagem da população brasileira utiliza as plantas nativas na medicina popular, sendo que estas plantas sofreram diferentes processos de extração e domesticação ao longo dos anos, com pouca documentação referente a estes processos (DIAS, 1995).

Atividades de ensino, pesquisa e extensão da Rede Fitocerrado nos últimos quatro anos

A primeira oficina organizada pela equipe Rede Fitocerrado aconteceu em 2008, com o título: **“Aprendendo a lidar com plantas medicinais”** (Figura 1) que contou com a participação de diversos setores da comunidade. Dentre o público presente havia estudantes de graduação, profissionais de saúde e do meio ambiente, e comunidade em geral.

Durante a realização da oficina anterior, tivemos a oportunidade não só de levar o conhecimento, mas recebe-lo também. Por isso, a partir de 2009 nossas oficinas foram intituladas: **“Aprendendo e ensinando sobre o uso e preparo de plantas medicinais”**.



Figura 1: Participantes e ministrantes da oficina: “Aprendendo a lidar com plantas medicinais”.

Outra oficina foi realizada para pais e alunos da Escola Estadual Inácio Castilho, na cidade de Uberlândia/MG. Nela ensinamos a preparar pomada anti-inflamatória, diferenciação de espécies como boldos, arnicas e cidreiras, e pela primeira vez incorporamos a farinha do jatobá preparando uma deliciosa e enriquecida bolacha (Figura 2).



Figura 2: Oficina Escola Estadual Inácio Castilho, Uberlândia/MG. Em A, alunos aprendendo a preparar pomada anti-inflamatória; B, pai e filho identificando espécies medicinais; C, bolacha de jatobá; e D, sachê repelente de citronela.

Levamos a mesma oficina para a XV Semana do idoso na cidade de Uberlândia/MG, organizada pelo grupo AFRID (Atividades Físicas e Recreativas para a Terceira Idade) da UFU em parceria com o SESC/MG. Nesta oficina tivemos a oportunidade de atender mais de 70 idosos que nos levaram vários relatos da experiência do uso de plantas medicinais. Assim, conduzimos a conversa no sentido de orientá-los sobre o uso racional, possíveis riscos de interação e toxicidade (Figura 3).



Figura 3: Oficina XV Semana do Idoso, Uberlândia/MG. Em A, um senhor relatando a importância do uso de plantas medicinais; B, público presente; C, relato de experiência; e D, preparo de tintura.

Em 2010, na Semana de Ciência e Tecnologia, participamos da III Semana Multidisciplinar, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – *Campus* Uberlândia, com a oficina “**Aprendendo e ensinando sobre o uso e preparo de plantas medicinais**” (Figura 4) e a palestra “**O Cerrado: biodiversidade de moléculas, saúde e inovação tecnológica**”. Durante a palestra tivemos a oportunidade de falar para alunos do curso técnico agrícola, sobre a importância do uso sustentável do Bioma Cerrado, incentivando sobre a geração de renda por meio da recomposição de áreas degradadas com plantas frutíferas do Cerrado e do potencial no mercado. Além disso, durante o preparo das bolachas de jatobá os alunos foram incentivados ao uso de alimentos enriquecidos.

Em 2011 participamos das atividades do evento “Mulher em ação”, promovido pelo SESC e TV Integração (Figura 5). Durante o evento distribuimos a nossa cartilha informativa (Figura 7), fizemos chás e orientamos o público sobre o uso correto de plantas medicinais.



Figura 4: Oficina durante as atividades da Semana Nacional de Ciência e Tecnologia. Alunos do curso técnico agrícola aprendendo a fazer bolacha de jatobá.



Figura 5: Rede Fitocerrado no evento Mulher em Ação. Em A, equipe Rede Fitocerrado; B-C, local de visitação; e D, preparo de chás.



Figura 6: Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, Uberlândia/MG. Em, A, aluno preparando pomada; B e C, alunos presentes; D, alunos preparando bolacha de jatobá.

Ainda em 2011, propusemos como atividade a oficina: "Plantas Medicinais: por que utilizá-las?" ministrada em duas escolas de ensino básico da cidade de

Uberlândia/MG. Atingimos um público de cerca de 800 alunos (Figura 6). O mais interessante foi ver o interesse dos alunos e as histórias contadas sobre chás que eles usaram ou alguém na família que eles conhecem que faz uso.

Estudos etnofarmacológicos e pesquisa com plantas medicinais desenvolvidos na UFU

No Instituto de Biologia da UFU já foram realizados vários estudos etnofarmacológicos, envolvendo também os distritos de Martinésia, Cruzeiro dos Peixotos e Tapuirama. Dentre eles, Damasceno (2007) encontrou na comunidade de Martinésia, 133 espécies pertencentes a 54 famílias de Angiospermas. Deste total apenas 29% são espécies nativas e o restante exóticas. A família predominante foi Asteraceae com 50 registros, e a espécie mais citada foi *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca), com 10 citações. Damasceno e Barbosa (2008), fizeram um estudo etnobotânico em comunidades do município de Uberlândia e encontrou 154 espécies de plantas para fins medicinais, 60 famílias e maior diversidade de espécies nativas que de exóticas. Também verificaram maior Importância Relativa para *Vernonia ferruginea* (assa peixe branco) e *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão).

Em 2008, o grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Foued Salmen Espindola aprovou no edital PROEXT/MEC o projeto “Rede Fitocerrado: identificação de práticas populares na cidade de Uberlândia/MG com plantas medicinais e atividades de capacitação através de cursos e oficinas. Neste projeto foram realizadas entrevistas não-estruturadas e semi-estruturadas somadas a observação participante direcionada a uma amostra da população de Uberlândia/MG, abordando dados sócio-econômicos, plantas conhecidas, indicações de uso, formas de obtenção, preparo e utilização, e comprovação de resultados. Nove especialistas locais (termo que se refere às pessoas que são excelentes conhecedoras de plantas medicinais na região) foram consultados no município. Foram registradas 119 plantas medicinais distribuídas em 58 famílias. As famílias com o maior número de espécies medicinais citadas foram: Asteraceae (18); Lamiaceae (13); Solanaceae (5); Euphorbiaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae (4); Apocynaceae, Crassulaceae, Fabaceae, Verbenaceae (3); Annonaceae, Bignoniaceae, Cucurbitaceae, Poaceae, Liliaceae, Malvaceae, Moraceae, Rosaceae, Rubiaceae, Simaroubaceae, Smilacaceae (2) (Oliveira, 2010).

Diversas preparações caseiras foram citadas, sendo a folha a parte mais utilizada do vegetal, atingindo percentual de 60% de todas as preparações. Com o presente trabalho foi possível perceber uma pequena valorização dessas práticas

populares entre a população em geral e entre os descendentes dos entrevistados ressaltando a importância dos cursos e oficinas propostos, bem como a sua manutenção.



Figura 7 – Capa da cartilha “Saúde para todos”.

Neste mesmo projeto, com intuito de favorecer ações educativas e contribuir nas mudanças de conceito, comportamento e atitudes frente ao uso de plantas medicinais, elaboramos uma cartilha informativa (Figura 7), intitulada “Saúde para todos”. Este é um instrumento que orienta, esclarece e estimula o uso racional de plantas medicinais, com propósito de aproximação dos saberes popular e acadêmico. A coleta, o armazenamento, o processamento e a higienização foram alguns dos temas abordados neste material. Em 2009, como fruto dos resultados do projeto, organizamos o IX Encontro da Rede Fitocerrado. O evento voltado para os especialistas locais com teve como objetivo orientar sobre os cuidados no uso e preparo de plantas medicinais, e incentivar os alunos e a comunidade sobre a importância da junção dos saberes acadêmico e tradicional (Figura 8).

IX Encontro da Rede FitoCerrado



PLANTAS MEDICINAIS:
CONECTANDO O SABER ACADÊMICO
AO SABER TRADICIONAL

19 de Dezembro de 2009

Local: Anfiteatro do Bloco 2A –Campus Umuarama
UFU

Figura 8: Material de divulgação do IX Encontro da Rede Fitocerrado.

O projeto de pesquisa aprovado pela FAPEMIG PPSUS//EDT–3257/06, vigência 2006-2009, intitulado: “Uso de inibidores de alfa-amilase para redução da hiperglicemia pós-prandial como ferramenta auxiliar na busca de nutraceuticos e fitofármacos para controle de Diabetes tipo 2 e obesidade” foi um estudo inicial para investigar um extrato de planta do Cerrado que culminou com a formação de quatro alunos de iniciação científica, quatro mestres e um doutor ganhador do “Prêmio UFU de Teses” PROPP/UFU 2011. Além disso, artigos frutos deste projeto já foram publicados ou estão em processo de publicação. Vinculado às atividades deste projeto, nós realizamos em 2009 o evento: **“Uso de nutraceuticos e plantas medicinais no controle do Diabetes mellitus e obesidade”** para orientar os profissionais de saúde, pacientes diabéticos e acadêmicos sobre os mitos e verdades no uso de plantas medicinais e nutraceuticos (Figura 9).



Figura 9: Palestrante e público no evento “Uso de nutracêuticos e plantas medicinais no controle do Diabetes mellitus e obesidade”.

Para o evento convidamos todas as Unidades Básicas de Saúde da Prefeitura de Uberlândia, quando uma assistente social relatou que um paciente com diabetes mellitus tipo 1 utilizou uma planta e reduziu o uso de insulina. Agendamos uma visita até a Unidade e conversamos com o médico Dr. Ricardo Rodrigues que relatou que fez vários exames neste paciente e a única explicação para a redução da utilização de insulina foi o uso do macerado aquoso de “quina-doce”. Por meio das atividades de extensão, chegamos a outro projeto de pesquisa aprovado no edital Universal pela FAPEMIG/APQ-01271-10, vigência 2010-2012, intitulado “Avaliação do extrato de *Vochysia* sp. sobre o controle glicêmico e a expressão de biomarcadores do estresse oxidativo e da via insulínica em animais diabéticos” (Figura 10). O evento culminou no fortalecimento do tripé pesquisa-extensão-pesquisa.



Figura 10: Procedimento vinculados ao projeto “Avaliação do extrato de *Vochysia* sp. sobre o controle glicêmico e a expressão de biomarcadores do estresse oxidativo e da via insulínica em animais diabéticos”. Em A e B, respectivamente estão registrados a coleta e processamento de *Vochysia rufa*.

Em 2011, aprovamos o projeto, edital PROEXT/MEC, intitulado “Plantas Medicinais: Universidade e Comunidade unidas para o uso sustentável e seguro”. Neste projeto incorporamos atividades de ensino, em que alunos do curso de biotecnologia da UFU foram levados para os laboratórios de Bioquímica e Mutagênese (INGEB/UFU) para aprender técnicas de pesquisa com plantas medicinais. Outro objetivo deste projeto foi o levantamento de monografias do Instituto de Biologia (UFU) sobre estudos etnofarmacológicos realizados no período de 2007-2011. A partir destas monografias foram levantados dados sócio-demográficos, espécies indicadas para diabetes e obesidade, modos de preparo e partes utilizadas destas plantas. Foram encontradas nove monografias relacionadas com levantamentos etnofarmacológicos, sendo citadas 31 espécies utilizadas como antidiabéticas, distribuídas em 23 famílias, em que as mais citadas foram as famílias Asteraceae, Alismataceae e Lamiaceae. A partir dos dados levantados realizamos buscas textuais para verificar se havia na literatura estudos com as espécies encontradas para controle de diabetes e obesidade. A partir deste levantamento estamos criando um banco de extratos com plantas em potencial para estudo antidiabético e, para isso, serão realizados ensaios de inibição de amilase e atividade antioxidante.

“Saberes populares e orientação à utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos na terceira idade”, foi um projeto aprovado em 2010, sob coordenação da Profa. Dra. Françoise Vasconcelos Botelho (UFU) no edital Interface pesquisa-extensão pela FAPEMIG/APQ-03196-10. Neste projeto foram realizadas 292 entrevistas domiciliares com participantes do programa AFRID em Uberlândia/MG, utilizando como instrumento de investigação um questionário semi-estruturado. A faixa etária dos entrevistados foi de 60-88 anos, com predominância de mulheres na amostra (87,7%). Dentre os idosos entrevistados verificou-se que 257 (88%) utilizavam medicamentos prescritos, principalmente para o controle da hipertensão, e a classe terapêutica com maior prevalência de uso foram os medicamentos que atuam no sistema cardiovascular, segundo a classificação ATC. A prática da automedicação esteve presente em 51% dos entrevistados. O uso de plantas medicinais foi relatado por 76,7% dos idosos, sendo que a maioria delas era cultivada pelos idosos, sendo identificadas 117 espécies vegetais, pertencentes a 59 famílias botânicas. Os dados da análise quantitativa do levantamento etnobotânico demonstraram que as famílias Lamiaceae e Asteraceae foram as mais expressivas em número de espécies, sendo as mais citadas *Cymbopogon citratus*, *Lippia alba*, *Melissa officinalis*, *Mentha sp.*,

Rosmarinus officinalis, *Plectranthus barbatus*, *Ocimum gratissimum* e *Ocimum basilicum*. A parte das plantas mais utilizada foi a folha, preparada principalmente por infusão (31,63%) e decocção (22,13%). Dezesseis entrevistados (5,5%) utilizaram fitoterápicos, principalmente aqueles preparados a partir de extratos de *Ginkgo biloba* e *Aesculus hippocastanum* (Machado, 2011). Além disso, durante a execução deste projeto desenvolvemos caderneta, cartilha e oficinas para os idosos abordando o uso seguro de plantas medicinais e fitoterápico. Dentro das atividades do projeto, organizamos o XII Encontro da Rede Fitocerrado com o tema: Saúde, beleza e nutrição na melhor idade (Figura 11).

Durante o evento foram abordados temas como resiliência na melhor idade e aspectos nutricionais, e foram apresentados os resultados do projeto e os cuidados com interações e efeitos colaterais envolvendo plantas medicinais e medicamentos.

Além de recursos a partir de órgãos de fomento a Rede Fitocerrado atua com recursos via emenda parlamentar, pela qual temos a oportunidade de desenvolver atividades de pesquisa e extensão junto a comunidade. Dentre elas citamos o trabalho realizado em 2010/2011, intitulado “Rede Fitocerrado: ações para incentivo à inovação tecnológica, uso sustentável de plantas medicinais e frutos do bioma cerrado e integração entre os conhecimentos popular e o acadêmico e por meio de atividades de ensino, pesquisa e extensão”. Neste projeto desenvolvemos ferramentas de trabalho para professores da rede pública e privada, fizemos intercâmbio de conhecimentos científico e popular, e tivemos a oportunidade de estimular as tradições e o uso racional de plantas medicinais.



Figura 11: Atividades do projeto “Saberes populares e orientação à utilização racional de plantas medicinais e fitoterápicos na terceira idade”. Em A, entrevistas na residência dos idosos; B, apresentação de dança do grupo AFRID; C, palestra com a farmacêutica Helen Lara Machado sobre interações medicamentosas; D, público presente; E, comissão organizadora; E, Vilma Lúcia Moura, membro da Rede Fitocerrado, preparando chás.

Conclusão

A inserção das atividades da Rede Fitocerrado proporcionou estímulos acadêmico e financeiro para o desenvolvimento dos projetos de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e do Laboratório de Biomoléculas do INGEB/UFU em consonância com o Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU. Isto demonstrou a relevância da associação dos projetos de extensão com a formação acadêmica de graduandos e pós-graduandos.

Realizar a extensão junto a formação na pós-graduação e da pesquisa com perspectivas de publicações científicas dentro das expectativas da CAPES podem ser ampliadas para um universo além das salas de aula e dos laboratórios como fonte de busca do conhecimento. O contato com as crianças, jovens e idosos, e a comunidade em geral, pode fazer do universitário, graduando e pós-graduando, um ser mais consciente e ético, pois possibilita a convivência diferenciada com este público que incluiu desde senhores analfabetos a pessoas com formação universitária e posições

de destaque na sociedade. Além disso, por meio das ações da Rede FitoCerrado estimulou-se a criação do APL (Arranjo Produtivo Local) de Biotecnologia do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, como uma perspectiva de impactar estas ações além do tripé ensino-pesquisa-extensão, mas incluindo a inovação como um aspecto fundamental e preconizado como prioritário pelo Ministério de Ciência e Tecnologia e as agências financiadoras de pesquisa. Ressaltando assim que é importante pesquisadores e seus orientandos pensarem na dimensão da formação e da pesquisa inserida com a extensão, porque atividades como simples oficinas para pessoas da comunidade, sejam elas crianças ou idosas, revelam uma nova dimensão do papel da Universidade na sociedade.

Referências

- BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Disponível em: http://www.fiocruz.br/far_novo/media/Decreto%205813.pdf. Acesso em 17 de novembro de 2010.
- Damasceno, A. A. Levantamento Etnobotânico na comunidade de Martinésia, Uberlândia, MG. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Uberlândia- MG, 2007, 26p.
- Damasceno, A.A.; Barbosa, A.A.A. Levantamento etnobotânico na comunidade de Martinésia, Uberlândia-MG. Horizonte Científico, 2008.
- Dias, T. Medicinal plants in Brazil. Newsletter - G15 Gene Banks for Medicinal & Aromatic Plants 7/8:4-5. 1995.
- Machado, H.L. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais e Fitoterápicos utilizados por idosos freqüentadores de um programa de atividades físicas (AFRID) em Uberlândia – MG. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – MG. Universidade Presidente Antônio Carlos – MG, 2011. 90p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF: 2006. 60 p.
- Oliveira, M.R. Rede Fitocerrado: Identificações de Práticas Populares em Uberlândia/ MG com Plantas Medicinais e Atividades de Capacitação através de cursos e oficinas. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Uberlândia- MG, 2010, 47p.

Simões, O.M.C.; Schenkel, R.P.; Gosmann, G.; Mello, P.C.J.; Mentz, A.L.; Petrovick, P.R. Farmacognosia da planta medicamento. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1999.