

**TATIANE VIEIRA BRAGA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE *Cissus  
verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* COMO  
ANTIOXIDANTE, ANTIFÚNGICO, HIPOGLICEMIANTE E  
CICATRIZANTE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Ouro Preto,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, para  
obtenção do título de “Magister  
Scientiae”.

**OURO PRETO**

**MINAS GERAIS – BRASIL**

**2008**

**TATIANE VIEIRA BRAGA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE *Cissus verticillata*  
Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* COMO ANTIOXIDANTE,  
ANTIFÚNGICO, HIPOGLICEMIANTE E CICATRIZANTE**

Vera Maria Peters

Sidney Augusto Vieira Filho

Tânia Toledo de Oliveira

(Co-orientadora)

Tanus Jorge Nagem

(Orientador)

B813 Braga, Tatiane Vieira.  
Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante  
[manuscrito] / Tatiane Vieira Braga. – 2008.  
xxiv, 175 f.: il. color., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Tanus Jorge Nagem.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos  
1. Antioxidantes - Teses. 2. *Cissus verticillata* - Teses. 3. Fitoterápicos - Teses.  
I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.4

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)

*Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como bronze que soa ou como címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada."*

I COR 13: 1, 2.

Dedico esta dissertação

Ao meu pai, minha mãe e a Talita, pelo amor, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao Cícero, meu grande amor, por toda a dedicação, paciência, e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida por terem me abençoado.

A Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CIPHARMA pela oportunidade de realização deste curso de mestrado.

A Fapemig através da rede Toxicologia e Farmacologia pelo apoio ao desenvolvimento deste projeto.

A todos os professores ligados ao CIPHARMA, por acreditarem e lutarem por este sonho.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, meu orientador, pela confiança, paciência, amizade e orientação durante toda esta caminhada.

A professora Tânia Toledo de Oliveira, pela disponibilidade, apoio, dedicação e orientação durante este estudo.

A professora Elisabete da Silva Barros, Laboratório de Micologia, Escola de Farmácia – UFOP, pelos ensinamentos e colaboração no trabalho de antifúngicos.

Ao professor Paulo Sérgio de Arruda Pinto, Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal e Microbiologia, Departamento de Veterinária - UFV, pela colaboração no trabalho de controle de qualidade de amostras comerciais.

Aos médicos Dr. Marcelo Rocha da Costa e Dra. Marilane Kayetta pela imensa colaboração, compreensão e dedicação na realização das análises histopatológicas.

Ao professor Sérgio Pacheco, pelo apoio e orientação.

Ao Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves e Maria Aparecida Leão, pela colaboração nas análises estatísticas.

A professora Ilza pela colaboração nas análises cromatográficas.

Ao professor Júlio Antônio Lombardi pela identificação botânica.

Ao professor Jorge Humberto pelo apoio no laboratório.

Aos grandes amigos que fiz no LAPPRONA, a Rosana Gonçalves Rodrigues das Dores, pelo carinho, incentivo e pela sua amizade. A Julina Tensol Pinto, por toda a dedicação e interesse, por todos os bons momentos e pela sua amizade. Ao Leandro, pela amizade e ajuda. A todos da iniciação, Taciane e Nadjla, pela ajuda e amizade. Márcia, Armando, Rafaela, Rúbia e Debóra, vou sentir saudades das tardes no laboratório. Ricardo Zatti, pela grande ajuda. Karina Zanoti Fonseca, pelo carinho e por sua amizade. Juliana Cristina, pela torcida. Geisla e Waleska, por deixarem os dias mais alegres. A Luana, Luciane e Cristiane.

A todos do Laboratório Biofármacos – UFV. Ao Edmir, Filipe, Maria Luísa e Décio, pela imensa ajuda no experimento *in vivo* e pelas tardes na Boca do Forno. Ao José Geraldo Pinto, pela colaboração nas análises bioquímicas.

Ao Jorge da botânica, pela paciência a ajuda na coleta do material vegetal.

A Patrícia, pelas horas de conversa na Estrada Real.

Ao Guto, pela ajuda nas referências.

As amigas Fernanda e Yonara, pelo carinho e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na conquista de mais essa etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b>	xvii
<b>RESUMO</b>	xxi
<b>ABSTRACT</b>	xxiii
<b>INTRODUÇÃO</b>	01
1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA	03
2. CONSTITUINTES QUÍMICOS	08
3. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	10
<b>CAPÍTULO 1 - CONTROLE DE QUALIDADE DAS FOLHAS DE <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson &amp; C. E. Jarvis subsp. <i>verticillata</i></b>	15
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Plantas medicinais e fitoterápicos	15
1.2. Controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos	18
2. OBJETIVO	21
Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Procedimentos gerais	22
3.1.1. Coleta e identificação	22
3.1.2. Processo de secagem	23
3.1.3. Preparação do extrato vegetal	23
3.2. Controle de qualidade do material vegetal	23
3.2.1. Percentual de massa fresca / massa seca	23
3.2.2. Determinação da perda por dessecação	24
3.2.3. Determinação de cinzas totais	24
3.3. Controle de qualidade de amostras comerciais de “Insulina vegetal”	25
3.3.1. Amostras	25
3.3.2. Embalagens, análise sensorial e elementos estranhos	25
3.3.3. Determinação da perda por dessecação	25
3.3.4. Qualidade microbiológica	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÃO	36
<b>CAPÍTULO 2 - ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson &amp; C. E. Jarvis subsp. <i>verticillata</i></b>	37
1. INTRODUÇÃO	37
1.1. Flavonóides	37
1.2. Atividade Antioxidante	42
1.2.1. Radicais livres	42
1.2.2. Radicais livres na patogênese da <i>Diabetes mellitus</i> e	



doenças cardiovasculares	43
1.2.3. Antioxidantes	44
2. OBJETIVO	46
Objetivos específicos	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Fracionamento do extrato hidroalcoólico	46
3.2. Perfil cromatográfico por CLAE	48
3.3. Quantificação de compostos fenólicos totais	49
3.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÃO	62

### **CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Cissus verticillata* (L.)**

Nicolson & C. E. Jarvis subsp. <i>verticillata</i>	63
1. INTRODUÇÃO	63
1.1. <i>Diabetes mellitus</i> e infecções fúngicas	63
1.2. Ação antifúngica	64
2. OBJETIVO	66
2.1. Objetivos específico	66
3. MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1. Preparo das amostras	66
3.2. Diluição das amostras	67
3.3. Microorganismos utilizados	67
3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÃO	72

### **CAPÍTULO 4 - ATIVIDADE DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E.**

Jarvis subsp. <i>verticillata</i> NO TRATAMENTO DA <i>Diabetes mellitus</i>	73
1. INTRODUÇÃO	73
1.1. Classificação da <i>Diabetes mellitus</i>	73
1.2. Quadro clínico e marcadores da <i>Diabetes mellitus</i>	79
1.3. Fármacos para <i>Diabetes mellitus</i>	81
1.4. Plantas com atividade hipoglicemiante	86
1.5. Principais aspectos dos coelhos utilizados no experimento	89
2. OBJETIVO	90
2.1. Objetivos específicos	90
3. MATERIAIS E MÉTODOS	90
3.1. Preparação das Cápsulas	90
3.2. Animais	92
3.3. Período de adaptação	93
3.4. Indução da diabetes	93
3.5. Organização dos grupos experimentais	94
3.6. Período de tratamento	95
3.7. Dosagens de parâmetros sanguíneos	95
3.8. Eutanásia	96
3.9. Estatística	96
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96

5. CONCLUSÃO	127
<b>CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson &amp; C. E. Jarvis subsp. <i>verticillata</i></b>	<b>128</b>
1. INTRODUÇÃO	128
1.1. Cicatrização	128
1.2. Inflamação	131
2. OBJETIVO	132
2.1. Objetivos específicos	132
3. MATERIAIS E MÉTODOS	133
3.1. Preparação do creme	133
3.2. Animais	133
3.3. Período de adaptação	133
3.4. Indução da ferida	133
3.5. Organização dos grupos experimentais	134
3.6. Período de tratamento	134
3.7. Dosagens de parâmetros sanguíneos	135
3.8. Eutanásia	135
3.9. Análise histológica	135
3.10. Estatística	136
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
5. CONCLUSÃO	150
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>151</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C. E. Jarvis_____	01
Figura 2 - Esquema da variação foliar de <i>Cissus verticillata</i> _____	06
Figura 3 - Inflorescências de <i>C. verticillata</i> _____	07
Figura 4 - Frutos de <i>C. verticillata</i> _____	07
Figura 5 - Distribuição geográfica de <i>Cissus verticillata</i> _____	08
Figura 6 - Estrutura química de flavonóides presentes em <i>C. verticillata</i> __	09
Figura 1.1 - Folhas de <i>C. verticillata verticillata</i> _____	22
Figura 1.2 - Aparência das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i> após secagem em estufa ventilada_____	27
Figura 1.3 - Aparência do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i> _____	30
Figura 1.4 - Aparência do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i> após secagem em evaporador rotatório_____	31
Figura 1.5 - Extrato hidroalcoólico seco de <i>C. verticillata verticillata</i> _____	31
Figura 1.6 - Amostras comerciais de “Insulina vegetal”_____	32
Figura 1.7 - Bolores e leveduras na amostra I_____	34
Figura 2.1 - Estrutura química da quercetina e rutina_____	40
Figura 2.2 - Esquema do fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i> _____	47
Figura 2.3 - Fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i> , com hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato_____	48
Figura 2.4 - Esquema da determinação de compostos fenólicos totais____	50

Figura 2.5 - Esquema da determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	52
Figura 2.6 - Cromatograma do extrato hidroalcoólico e do flavonóide rutina (condição 1) à 359,6 nm	53
Figura 2.7 - Sobreposição dos cromatogramas do extrato hidroalcoólico e do flavonóide rutina (condição 1) à 359,6 nm	54
Figura 2.8 - Cromatograma da fração acetato de etila (condição 2) a 359,6 nm e espectros ultravioleta dos picos	55
Figura 2.9 - Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila de e do flavonóide rutina à 359,6 nm sobrepostos	57
Figura 2.10 - Teor de compostos fenólicos expressos em equivalentes de ácido tânico do extrato hidroalcoólico (EHA), fração diclorometano (FD) e fração acetato de etila (FA)	58
Figura 3.1 - Estrutura química de biciclogermacreno e resveratrol	65
Figura 3.2 - Método de microdiluição em placa para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento de <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i>	70
Figura 3.3 - Estrutura química do mentol	70
Figura 4.1 - Defeitos metabólicos básicos da <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2	75
Figura 4.2 - Defeitos na secreção de insulina no <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2	76
Figura 4.3 - Sítios de ação de quatro classes de hipoglicemiantes	82
Figura 4.4 - Ações do GLP-1 nos diversos órgãos	84
Figura 4.5 - Manipulação das cápsulas com o extrato de <i>C. verticillata</i> supsp. <i>verticillata</i>	91

Figura 4.6 - Coelho da raça Nova Zelândia_____	92
Figura 4.7 - Administração intraperitoneal de aloxano nos coelhos_____	93
Figura 5.1 - Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, não tratado_____	146
Figura 5.2 - Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo normal____	147
Figura 5.3 - Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com creme de <i>C. verticillata verticillata</i> a 5% p/v_____	148
Figura 5.4 - Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com creme de <i>C. verticillata verticillata</i> a 10 % p/v_____	149

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Comparações das médias (g) e desvio padrão de análises dos diferentes tratamentos de folhas de <i>C. verticillata verticillata</i>	28
Tabela 1.2 - Dados do ensaio de determinação da perda por dessecação das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i>	29
Tabela 1.3 - Caracteres organolépticos das amostras comerciais de “Insulina vegetal”	33
Tabela 1.4 - Teores de umidade (%) das amostras comerciais de “Insulina vegetal”	33
Tabela 1.5 - Contaminantes encontrados nas amostras comerciais de “Insulina vegetal”	34
Tabela 2.1 - Classe de flavonóides e algumas características conhecidas	39
Tabela 2.2 - Gradiente da mistura de MeOH-H <sub>2</sub> O (condição 1) utilizado na CLAE do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i>	49
Tabela 2.3 - Gradiente da mistura de MeOH-H <sub>2</sub> O (condição 2) utilizado na CLAE da fração acetato de etila das folhas de <i>C. verticillata verticillata</i>	49
Tabela 2.4 - Porcentagem da atividade antioxidante pela metodologia do DPPH, do extrato hidroalcoólico (EHA), fração dicloro (FD), fração acetato (FA) e BHA	59
Tabela 3.1 - Concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico e frações de <i>C. verticillata verticillata</i> pelo método de microdiluição em placa	69
Tabela 4.1 - Classificação etiológica da <i>Diabetes mellitus</i>	73
Tabela 4.2 - Grupos de coelhos utilizados nos testes de avaliação da atividade hipoglicemiante de <i>C. verticillata verticillata</i>	95

- Tabela 4.3 - Valores médios de glicose ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*\_\_\_\_\_97
- Tabela 4.4 - Valores médios de insulina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_100
- Tabela 4.5 - Valores médios de cortisol ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_102
- Tabela 4.6 - Valores médios de colesterol total ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_103
- Tabela 4.7 - Valores médios de HDL colesterol ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_104
- Tabela 4.8 - Valores médios de triglicérides ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_104
- Tabela 4.9 - Valores médios de Albumina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_105
- Tabela 4.10 - Valores médios de proteínas totais ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_107
- Tabela 4.11 - Valores médios de creatinina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_108
- Tabela 4.12 - Valores médios de uréia ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_109
- Tabela 4.13 - Valores médios de ácido úrico ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_110
- Tabela 4.14 - Valores médios de Aspartato aminotransferase (AST) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_111

Tabela 4.15 - Valores médios de Alanina aminotransferase (ALT) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_112

Tabela 4.16 - Valores médios de Fosfatase alcalina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_113

Tabela 4.17 - Valores médios de leucócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_115

Tabela 4.18 - Valores médios de linfócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_116

Tabela 4.19 - Valores médios de monócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_117

Tabela 4.20 - Valores médios de granulócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_118

Tabela 4.21 - Valores médios de hemácias ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_119

Tabela 4.22 - Valores médios de hemoglobina ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_120

Tabela 4.23 - Valores médios de hematócrito ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_121

Tabela 4.24 - Valores médios de volume corpuscular médio ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_122



Tabela 4.25 - Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_123

Tabela 4.26 - Valores médios de concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_124

Tabela 4.27 - Valores médios da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_125

Tabela 4.28 - Valores médios de plaquetas ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *C. verticillata verticillata*\_126

Tabela 5.1 - Grupos de coelhos utilizados no teste de avaliação da atividade cicatrizante das folhas de *C. verticillata verticillata* \_\_\_\_\_134

Tabela 5.2 - Valores médios de aspartato aminotransferase ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_136

Tabela 5.3 - Valores médios de alanina aminotransferase ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_136

Tabela 5.4 - Valores médios de fosfatase alcalina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_137

Tabela 5.5 - Valores médios de proteínas totais ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_138

Tabela 5.6 - Valores médios de albumina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_138

Tabela 5.7 - Valores médios de leucócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_139

Tabela 5.8 - Valores médios de linfócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_139

Tabela 5.9 - Valores médios de monócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_140

Tabela 5.10 - Valores médios de granulócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_141

Tabela 5.11 - Valores médios de hemácias ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_141

Tabela 5.12 - Valores médios de hemoglobina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_142

Tabela 5.13 - Valores médios de hematócrito ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_142

Tabela 5.14 - Valores médios de volume corpuscular médio (VCM) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_143

Tabela 5.15 - Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_143

Tabela 5.16 - Valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_144

Tabela 5.17 - Valores médios de amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_144

Tabela 5.18 - Valores médios de plaquetas ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *C. verticillata verticillata*\_\_\_\_\_145

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg/ml – micrograma(s) por mililitro

·OH – radical hidroxila

µL – microlitro(s)

AAT – atividade antioxidante

ATCC - American Type Culture Collection

Abs – absorbância

ADP – adenosina difosfato

AINES – antiinflamatórios não esteroidais

ALT – Alanina aminotransferase

Ang II – angiotensina II

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – adenosina trifostato

BHA – butilhidroxianisol

CCD – cromatografia de camada delgada

CE – Ceará

CE<sub>50</sub> – concentração efetiva em 50%

Cetoc – cetoconazol

CHCM – concentração da hemoglobina corpuscular média

CIM – concentração inibitória mínima

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

cm – centímetro(s)

CV – coeficiente de variação

DL<sub>50</sub> – dose letal em 50%

DL<sub>50</sub> – dose letal em 50%

DM – *Diabetes mellitus*

DMSO – dimetilsulfóxido

dp – desvio padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EHA – extrato hidroalcoólico

FA – fração acetato

FAL – fostatase alcalina  
Faq – Fase aquosa  
FC – fração clorofórmio  
FD – fração diclorometano  
FH – fração hexano  
Fig. - figura  
Flu – fluconazol  
g – grama(s)  
g/dL – grama(s) por decilitro  
g/Kg – grama(s) por quilo  
g/L – grama(s) por litro  
G1 – grupo 1  
G2 – grupo 2  
G3 – grupo 3  
G4 – grupo 4  
Hb – hemoglobina  
HCM – hemoglobina corpuscular média  
HDL – High Density Lipoprotein  
HIV – Human Immunodeficiency Virus  
Ht – hematócrito  
IFN – interferon  
IL-1 – interleucina 1  
IMC – índice de massa corporal  
IRS-1 – substrato do receptor de insulina 1  
Kg – quilo(s)  
L – litro(s)  
LCAT – lecitina colesterol aciltransferase  
LDL – Low Density Lipoprotein  
M – mentol  
m – metro(s)  
mg – miligrama(s)  
mg/dL – miligrama(s) por decilitro

mg/Kg – miligrama(s) por quilo  
min – minuto(s)  
mL – mililitro(s)  
mM – milimol(es)  
MPO – mieloperoxidase  
MOPS - morfolinopropanosulfônico  
nm – nanômetro(s)  
°C – graus Celsius  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
P1 – precipitado 1  
PCA – *plate count Agar*  
PCR – proteína C reativa  
pg – picograma(s)  
PI3 cinase – fosfatidilinositol 3 cinase  
pmol/L – picomol por litro  
ppm – partes por milhão  
PSF – Programa Saúde da Família  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
RPMI - meio Rowell Park Memorial Institute (segundo protocolo M27-A2 do CLSI)  
subsp. – subespécie  
SUS – Sistema Único de Saúde  
Tab. - tabela  
TME – tratamento massa após secagem em estufa  
TMF – tratamento massa fresca  
TMS – tratamento massa seca  
TNF – fator de necrose tumoral  
TPA – tratamento percentual de água  
TPC – tratamento percentual de cinzas  
TPMS – tratamento percentual de massa seca  
UFC – unidade formadora de colônia  
UFC/g – unidades formadoras de colônias por grama

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

UFV – Universidade Federal de Viçosa

UV – ultravioleta

UV-B – ultra violeta B

VCM – volume corpuscular médio

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

## RESUMO

BRAGA, Tatiane Vieira. Universidade Federal de Ouro Preto, julho de 2008. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante.** Orientador: Tanus Jorge Nagem. Co-orientadora: Tânia Toledo de Oliveira.

A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* é conhecida popularmente como “insulina vegetal” e utilizada popularmente como hipoglicemiante. Neste trabalho avaliou-se primeiramente o processo de coleta e secagem da amostra vegetal e a qualidade de amostras comerciais de “insulina vegetal”. O material vegetal foi coletado em Ouro Preto, Minas Gerais, e a exsicata depositada no Herbário José Badini da UFOP (OUPR 20570). As folhas de *C. verticillata verticillata* possuem teor de água de 85,52%. O processo de secagem em estufa de ventilação forçada, a temperatura de 45°C, foi eficaz, proporcionando folhas com teor de 11,47% de umidade e 17,99% de cinzas totais. Nas amostras comerciais de “Insulina vegetal” foram encontrados altos valores na carga de mesófilos aeróbios. O perfil cromatográfico de *C. verticillata verticillata* confirmou a presença de rutina na fração acetato de etila das folhas. Também foi avaliado a atividade antioxidante através da determinação de compostos fenólicos totais e metodologia do DPPH. A quantificação de compostos fenólicos totais em EHA, FD e FA foi respectivamente 381,0, 52,0 e 2574,0 mg/mL em equivalentes de ácido tânico. A atividade antioxidante determinada através da metodologia do DPPH foi de 11,68, 20,24 e 70,06% em EHA, FD e FA respectivamente. Determinou-se a atividade antifúngica visando novos compostos antifúngicos de origem vegetal que possam auxiliar a terapêutica. A FD teve CIM de 125



$\mu\text{g/mL}$  para *C. krusei*, e a FC teve CIM de 125  $\mu\text{g/mL}$  para *C. tropicallis*. Na avaliação da atividade hipoglicemiante a dose de 4,5 mg/Kg reduziu a glicemia em 35% e a dose de 13,5 mg/Kg foi a mais eficaz, reduzindo a glicemia em 60% aos 28 dias. Nenhuma das doses testadas alterou os níveis plasmáticos de insulina. A dose de 13,5 mg/Kg reduziu os níveis de triglicérides em 70%. O extrato de *C. verticillata verticillata* auxiliou o processo de cicatrização das feridas cutâneas em coelhos.

## ABSTRACT

BRAGA, Tatiane Vieira. Universidade Federal de Ouro Preto, July, 2008. **Assessment of pharmacological activity of *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* as antioxidant, antifungal, hypoglycaemic and healing.** Adviser: Tanus Jorge Nagem. Co-advisor: Tânia Toledo de Oliveira.

The species *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* is popularly known as “vegetable insulin” and is used in diabetes’ treatment. In this work it was evaluated, at first, the process of crop and drying of the vegetal sample and the commercial sample’s quality of vegetal insulin. The vegetal material was collected in Ouro Preto, Minas Gerais, and the excicata was stored in the José Badini Herbarium of UFOP (OUPR 20570). The leaves of the *C. verticillata verticillata* have an amount of water by 85,52%. The drying process in the oven with forced ventilation, 45°C of temperature, was efficient, leading to leaves with 11.47% of humidity and 17.99% of total ashes. In the commercial samples of “vegetal Insulin” high values of mesophilic aerobic load were found. Afterwards, it was evaluated the chromatographic profile of *C. verticillata verticillata* which confirmed the presence of rutin in the fraction ethyl acetate of the leaves. The antioxidant activity was also evaluated by determination of the total phenolics’ compound and the DPPH’s methodology. The quantification of total phenolics’ compounds in EHA, FD and FA was, respectively, 381.0, 52.0 and 2574.0 mg/mL in equivalent of tanic acid. The antioxidant activity by the methodology of DPPH was of 11.68, 20.24 and 70.06 in EHD, FD and FA, respectively. It was determined the antifungal activity aiming at new antifungal compounds of vegetal origin that are able to auxiliary the therapeutics. The FD had CIM of 125 ug/mL for *C. krusei*, and the FC had CIM of 125 ug/mL for *C.*

*tropicallis*. In the evaluation of the hipoglycaemic activity the dose of 4.5 mg/Kg reduced the glycemia by 35% and the dose of 13.5 mg/Kg was more efficient, reducing the glycemia by 60% in 28 days. None of the assessed doses modified the plasmatic levels of insulin. The 13.5 mg/Kg doses reduced the triglycerides levels by 70%. The extract of *C.verticillata verticillata* helped the process of healing of skin wounds in rabbits.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis (Fig. 1) é conhecida popularmente como insulina vegetal (OLIVEIRA, 2006), cortina japonesa, cipó-pucá (BARBOSA *et al.*, 2002), anil trepador (BELTRAME *et al.*, 2001; CORRÊA, 1926; SOUZA & LORENZI, 2005), uva-brava, achite, caavurana-de-cunhan, tinta dos gentios e bejuco caro (CORRÊA, 1926).



Fonte: ALIPI & PICHARDO, 2007.

**Figura 1:** *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis.

Na medicina popular *C. verticillata* é utilizada na forma de chá das folhas no tratamento da diabetes (BARBOSA *et al.*, 2002). É utilizada também como antiinflamatório, antiepilético, antihipertensivo, antitérmico, antireumático (BELTRAME *et al.*, 2001), antigripal, contra infecções respiratórias (GARCIA *et al.*, 1999; AGRA, FREITA & BARBOSA-FILHO, 2007), dislipidemia, problemas urinários (LANS, 2006) e indigestão (FERREIRA *et al.*, 2008). Na região de Ouro Preto, Minas Gerais, o chá das folhas, preparado pelo método de infusão, é utilizado com o objetivo de diminuir a glicemia por pacientes diabéticos.

Estudo etnofarmacológico constatou que a população utiliza cerca da 1,0 g do pó das folhas em 150,0 mL de água. Foi determinado o peso seco de 1,0 mL do infuso, obtendo-se peso médio do material sólido de 1,8 mg. Como o ser humano (peso médio dos voluntários do estudo 60,0 Kg) bebe cerca de 150,0 mL (1 xícara) do infuso por dia, estabeleceu-se que a dose de uso popular é 4,5 mg/Kg ao dia (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A *Diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. (CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002; SKILER, 2004). Está associada à maior produção de radicais livres, maior incidência de infecções por *Candida* sp. e problemas com a cicatrização de feridas (UCHÔA *et al.*, 2007; SCHECHTER & GUIMARÃES-WALKER, 2004; MORAES *et al.*, 2000).

Cerca de 171 milhões de pessoas sofrem de DM no mundo e estima-se que este número chegue a 366 milhões em 2030 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2003; WILD, 2004; FERREIRA, 2008).

Aproximadamente 4,0 milhões de mortes ao ano são atribuíveis às complicações da DM e os custos em atenção ao paciente diabético variam de 2,5% a 15% dos orçamentos anuais de saúde. O Brasil está entre os dez países com maior número de pacientes diabéticos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2003; WILD, 2004) e no país a taxa de mortalidade por diabetes é 41,8 óbitos por 100 mil habitantes (INDICADORES E DADOS BÁSICOS BRASIL, 2005). Aproximadamente metade dos pacientes desconhece o diagnóstico e ¼ dos reconhecidamente portadores de DM não faz qualquer tipo de tratamento (ROCHA *et al.*, 2002).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) vem atendendo número crescente de pacientes com DM. Em 1998 foram 0,19 milhões de atendimentos e em 2004 esse número subiu para 5,86 milhões de atendimentos por ano (FERREIRA, 2008).

## **1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

De acordo com LOMBARDI (2004), a classificação taxonômica de *Cissus verticillata* é:

- Reino: Plantae;
- Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);
- Superdivisão: Spermatophyta (plantas com sementes);
- Divisão: Magnoliophyta (plantas com flor);
- Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas);
- Subclasse: Rosidae;

- Ordem: Rhamnales. Incluem-se nesta ordem apenas 3 famílias: Rhamnaceae, Vitaceae e Leaceae.
- Família: Vitaceae.

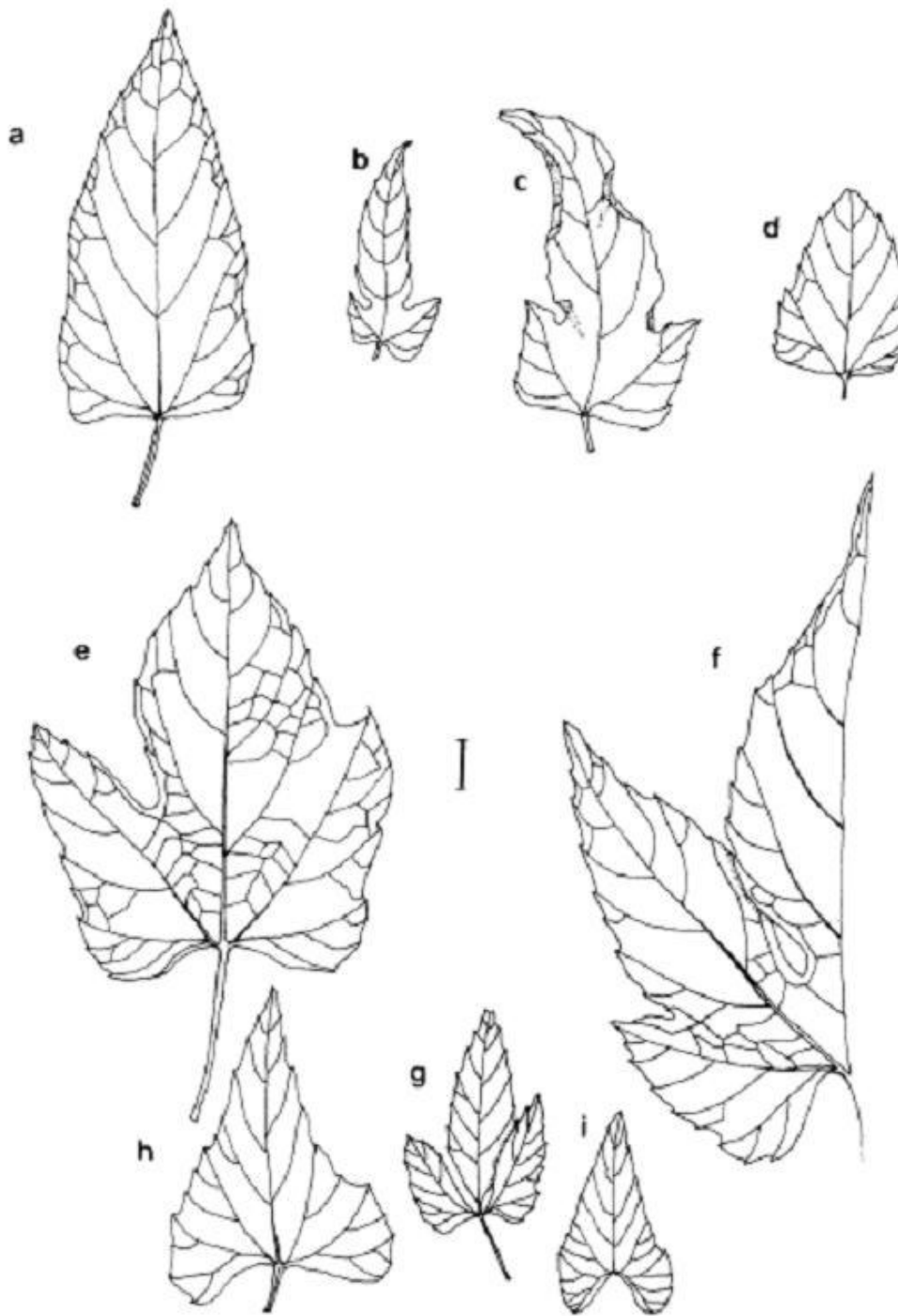
A família Vitaceae é de distribuição tropical e subtropical, incluindo cerca de 12 gêneros e 800 espécies. As espécies dessa família são lianas ou raramente ervas não escandentes ou arvoretas, geralmente com gavinhas opostas às folhas (representando inflorescências modificadas); as folhas são alternas, simples ou compostas, freqüentemente palminérvas, geralmente com estípulas (Fig. 1). Inflorescência cimosa ou paniculada, terminal, axilar ou oposta às folhas (Fig. 1); flores geralmente pouco vistosas, bissexuadas ou unissexuadas, actinomorfas, diclamídeas; cálice geralmente muito reduzido, 4-5-mero, gamossépalo, prefloração valvar ou aberta; corola 4-5-mera, dialipétala ou gamopétala (formando uma caliptra em *Vitis*); estames em número igual ao das pétalas, anteras rimosas, disco nectarífero ou glândulas nectaríferas isoladas presentes; ovário súpero, bilocular, placentação axial, 2 óvulos por lóculo. Fruto baga (SOUZA & LORENZI, 2005).

O gênero *Cissus* (L.) é o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies. Na América do Sul esse é o único gênero de ocorrência natural, com exceção de uma única espécie do gênero *Vitis* que ocorre naturalmente no noroeste do continente sul-americano. *Cissus* é um gênero neotropical, ocorrendo principalmente na América do Sul. As espécies ocorrem em matas primárias, secundárias, cerrados, caatingas, campos, vegetações de altitude e litorânea (LOMBARDI, 1994).

*Cissus sicyoides* é sinóníma de *C. verticillata* deixando, portanto, de ser usado (LOMBARDI, 1994).

*C. verticillata* pode ser encontrada como trepadeira (com até 10 metros) ou arbusto perene (com até 3 metros). Tem caule flexível, às vezes com pêlos (caules jovens). Sobre o caule, no ponto onde nasce cada folha, ocorre um par de estípulas. As folhas são alternadas, simples e de formas variáveis (ovaladas, ovaladas-elípticas ou oblongas), lobadas ou profundamente partidas, podendo atingir 15 cm de comprimento por 12,5 cm de largura, pontiagudas, de base variável (redonda, cordada, sagitada), às vezes cobertas de pêlos e margens denteadas (Fig. 2). As inflorescências são opostas às folhas, com flores pequenas, branco-esverdeadas, brancas, amarelas ou raramente rosas (Fig. 3). Os frutos (Fig. 4) são obovóides a globosos, carnosos, com até 1 cm de largura, de cor púrpura a negro (ALIPI & PICHARDO, 2007). Os frutos de *C. verticillata* podem ser comidos, apesar de insípidos (LOMBARDI, 1994).





Fonte: Lombardi, 1994.

**Figura 2:** Esquema da variação foliar de *Cissus verticillata*.

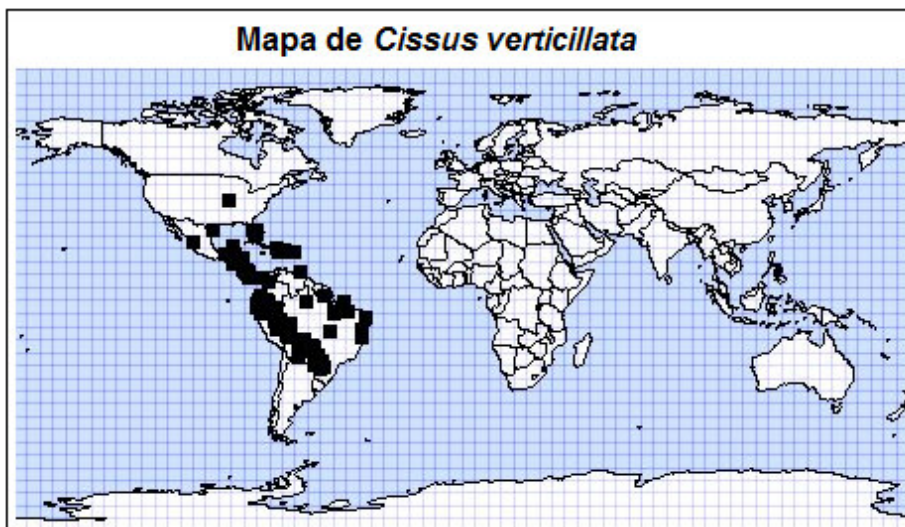


**Figura 3:** Inflorescências de *C. verticillata*.



**Figura 4:** Frutos de *C. verticillata*.

A espécie desenvolve-se em altitudes de 0 a 1800 m, florindo e frutificando ao longo de todo o ano. Distribui-se do México, Caribe e América do Sul, exceto no Chile até o centro-sul da Argentina (Fig. 5) (LOMBARDI, 2000).



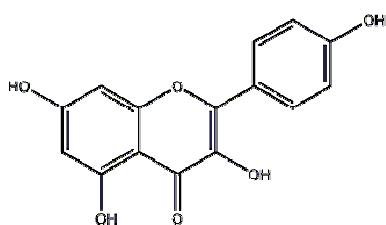
Fonte: <http://www.tropicos.org>

**Figura 5:** Distribuição geográfica de *Cissus verticillata*.

## **2. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

A espécie vegetal *C. verticillata* contém cetoesteróides, carotenóides, vitamina E e alcalóides. Na fração acetato de etila, do extrato aquoso das folhas, foram isolados os flavonóides kaempherol (3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona), luteolina (2-(3,4-Di-hidroxifenil)-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e sulfato de 3`luteolina (BARBOSA *et al.*, 2002). Na análise por cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD)

pode-se constatar a ocorrência de quercetina (2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona) e kaempferol (Fig. 6). O doseamento de flavonóides totais por espectroscopia no UV forneceu valores de 4,75% no vegetal seco, 3,8% no extrato aquoso, 3,6% no extrato fluido e 3,2% na tintura. Assim, pode-se propor a quercetina como marcador nas análises de controle de qualidade por CCD (SOARES & BARBOSA, 2007).



#### Kaempferol

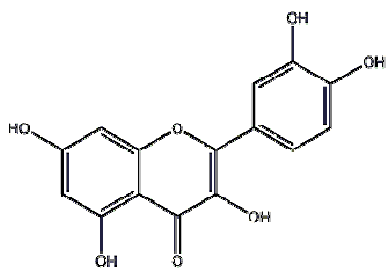
(3,5,7-tri-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4h-1-benzopiran-4-ona),

3,4',5,7-tetra-hidroxyflavona

C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>

Peso molecular: 286,23

C 62,94%, H 3,52%, O 33,54%



#### Quercetina

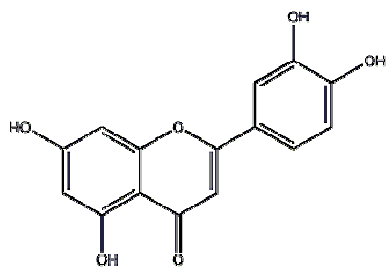
quercetina ((2-(3,4-Di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona

3,3',4',5,7-pentahydroxyflavona

C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

Peso molecular: 302,23

C 59,61%, H 3,34%, O 37,06%



#### Luteolina

2-(3,4-Dihidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona

3',4',5,7-tetrahydroxyflavona

C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>

Peso molecular: 286,23

C 62,94%, H 3,52%, O 33,54%

**Figura 6:** Estrutura química de flavonóides presentes em *C. verticillata*.

Na análise do extrato hidroalcoólico da planta inteira constatou-se a presença dos metabólitos secundários taninos, terpenos esteróides/triterpenóides e alcalóides (DOMINICI *et al.*, 2003). Já das partes aéreas foram isoladas e identificadas as cumarinas 5,6,7,8-tetra-hidroxicumarina-5 $\beta$ -xylopyranosídeo e sabadina, os flavonóides Kaempherol 3- $\alpha$ -ramínosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -ramínosídeo e os triterpenos esteroidais  $\beta$ -sitosterol, sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo e antocianinas (BELTRAME, FERREIRA & CORTEZ, 2002; GARCIA *et al.*, 1999).

Do extrato metanólico das partes aéreas de *Cissus sicyoides* foram também identificados os compostos  $\beta$ -sitosterol e sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (BELTRAME *et al.*, 2002). O biciclogermacreno foi encontrado no extrato clorofórmico das folhas (SILVA *et al.*, 2007) e o resveratrol (3',4',5-triidroxiestilbeno) no extrato acetato de etila das folhas (SILVA *et al.*, 2007; QUÍLEZ *et al.*, 2004).

### **3. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis**

Na administração do extrato aquoso das folhas de *C. verticillata* em ratos normoglicêmicos detectou-se 19,5% de redução na glicemia dos animais tratados em relação ao grupo controle. No grupo tratado com esse extrato observou-se também o aumento do consumo de líquido. Os animais do grupo controle ingeriram em média 60,0 mL de água enquanto os do grupo tratado consumiram 100,0 mL de extrato (BARBOSA *et al.*, 2002).

Ratos diabéticos, induzidos por estreptozocina, que receberam o decocto das folhas de *C. verticillata* no lugar da água, reduziram a ingestão de líquidos e alimentos, e o volume urinário excretado. Também ocorreu redução significativa na glicemia, uréia e glicosúria dos animais tratados quando comparados com o grupo controle. O metabolismo lipídico e os níveis de glicogênio hepático não foram afetados pelo tratamento nos animais diabéticos (PEPATO *et al.*, 2003).

Em ratos com diabetes induzida por aloxano, tratados por período de 7 dias, com extrato aquoso das folhas de *C. verticillata*, nas doses de 100 e 200 mg/Kg, observou-se redução significativa dos níveis de glicemia em 25 e 22% respectivamente. Depois do quarto dia de tratamento, com dose de 200 mg/Kg, os níveis de triglicerídeos reduziram 48%. Não ocorreram alterações nos níveis de Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato aminotransferase (AST) (VIANA *et al.*, 2004).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata* na dose de 1,0 mg/Kg, administrado por via intragástrica em ratos Wistar, aumentou o grau de intolerância à glicose promovido pela dexametasona, sugerindo um efeito diabetogênico (BELTRAME *et al.*, 2001).

A administração do extrato metanólico de *C. verticillata* a ratos Wistar reduziu significativamente lesões gástricas induzidas por diferentes agentes ulcerogênicos. O efeito observado possivelmente envolve aumento nos mecanismos de defesa da mucosa gastrointestinal, tais como óxido nítrico e grupos sulfidríla que previnem ou atenuam o processo da úlcera (FERREIRA *et al.*, 2008).

O extrato seco de *C. verticillata*, nas doses de 300 e 500 mg/Kg, administrados a ratos Wistar por via oral promoveu significativo efeito antiinflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina. No modelo tópico de inflamação induzido por acetato de tetradecanoilforbol o extrato de *C. verticillata* reduziu o processo inflamatório em 50%. Em homogenato do tecido inflamado observou-se redução nos níveis da enzima mieloperoxidase (GARCIA *et al.*, 2000).

O extrato aquoso de *C. verticillata*, com um rendimento de 8,22% no processo de extração, apresentou atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARCIA *et al.*, 1999). Adicionalmente o extrato aquoso mostrou efeito vasoconstritor nos anéis da aorta de cobaia, atuando através do aumento da entrada de cálcio nas células (GARCIA *et al.*, 1997).

Os compostos  $\beta$ -sitosterol e sitosterol- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, obtidos a partir do extrato metanólico das partes aéreas de *C. verticillata*, apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* com concentração inibitória mínima de 50 e 100  $\mu$ g/mL respectivamente (BELTRAME *et al.*, 2002).

Na análise da atividade antifúngica das folhas de *C. verticillata*, pelo método de bioautografia direta utilizando o fungo filamentosso *Cladosporium sphaerospermum*, os extratos clorofórmio e acetato de etila mostraram atividade antifúngica moderada, enquanto os demais extratos não foram efetivos. No extrato clorofórmico identificou-se o sesquiterpenóide biciclogermacreno e no extrato acetato de etila o composto resveratrol (SILVA *et al.*, 2007a). Foi observado que a fração em clorofórmio dos extratos das folhas de *C. verticillata* possui atividade fungitóxica sobre *Cladosporium*

*sphaerospermum* mais elevada no outono e primavera, quando comparado às outras estações do ano. O biciclogermacreno também foi identificado no óleo essencial de *Piper cernuum* e *Piper regnellii*, que possuem atividade antimicrobiana. Já o resveratrol tem atividade contra dermatófitos e bactérias de pele em humanos (SILVA *et al.*, 2007b).

A pesquisa pré-clínica realizada com a alcoolatura de *C. verticillata* em modelos de ação anticonvulsivante não confirmou esta atividade preconizada popularmente (BRASIL, MS, 2006).

O extrato aquoso de *C. verticillata*, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 µg/mL, não reduziu os efeitos citotóxicos característicos de cepas do vírus da influenza quando infectam células MDCK (LIZAMA, MARTINEZ & PÉREZ, 2000).

A infusão da folhas de *C. verticillata* nas concentrações de 0,07 e 0,70 mg/mL não causaram alterações no ciclo celular de células meristemáticas de *Allium cepa* (L.). O teste com células de *A. cepa* é utilizado para avaliar efeitos citotóxicos, onde a substância teste entra em contato direto com as células, podendo avaliar diferentes concentrações e diferentes tempos de tratamento. A infusão, nas mesmas concentrações, não promoveu aumento estatisticamente significativo no número de alterações cromossômicas em células da medula óssea de ratos Wistar (VICENTINI *et al.*, 2001).

No ensaio toxicológico pré-clínico e clínico realizado por VASCONCELOS (2004), foram observadas pequenas variações hematológicas e bioquímicas que não comprometem a investigação farmacológica da espécie.



Em estudo toxicológico pré-clínico agudo, realizado em camundongos Swiss, tratados com as doses de 5,0 g/Kg por via oral e 2,0 g/Kg por via intraperitoneal da fração aquosa das folhas de *C. verticillata*, obteve-se valores de DL<sub>50</sub> superiores a 5,0 g/Kg por via oral e 2,0 g/Kg por via intraperitoneal. Já na avaliação dos parâmetros bioquímicos foi detectado aumento na alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (FAL) indicando alterações hepáticas que podem ter ocorrido devido à dose suficientemente alta administrada neste experimento, sendo que a dose utilizada popularmente é de 4,5 mg/Kg (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Foram realizados ensaios clínicos de fase II com o infuso das folhas de *Cissus verticillata* para investigar a eficácia terapêutica desse vegetal em mulheres voluntárias, intolerantes à glicose, e em voluntárias diabéticas; ambos os grupos com idade entre 30 e 59 anos. No grupo de intolerantes á glicose, o chá das folhas teve atividade hipoglicemiante significativa aos 120 minutos, porém não houve aumento da insulinemia, além da fisiológica, sugerindo que esse efeito não ocorreu por liberação ou secreção da mesma. No grupo com diabetes, o infuso não apresentou efeito hipoglicemiante significativo (SANTOS *et al.*, 2008).

## CAPÍTULO 1

### CONTROLE DE QUALIDADE DAS FOLHAS DE *Cissus verticillata* (L.)

#### Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Plantas medicinais e fitoterápicos

Práticas terapêuticas utilizando as plantas medicinais sempre exerceram importante papel na busca de melhores condições de saúde pelo homem (BRASIL, MS, 2006). A cultura local influencia a utilização destas terapêuticas. No Brasil, as culturas indígenas, negras e européias exercem grande influência na medicina popular (MACEDO, 2004). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar e modificar um processo fisiológico normal ou patológico, e ainda como fonte de fármacos e de seus precursores (ARIAS, 1999).

O uso de fitoterápicos, medicamentos preparados exclusivamente à base de plantas medicinais (SIMÕES, 2004), com finalidade profilática, curativa, paliativa e com fins de diagnóstico, passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978 (BRASIL, MS, 2006).

A legislação brasileira (Resolução-RDC nº 48, 2004) define que “fitoterápico é medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos

etnofarmacológicos de utilização, documentação científica em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”.

Os ensaios clínicos são realizados no processo de desenvolvimento de novos medicamentos e envolvem quatro fases. Na fase 3 ocorre a avaliação em larga escala do fármaco onde são realizados testes em 1000 a 5000 pacientes voluntários, com o objetivo de confirmar a eficácia e monitorar possíveis reações adversas, tendo duração média de 3,5 anos (QUENTAL & FILHO, 2006; ESCOSTEGUY, 1999).

Sabe-se que 80% da população mundial depende das práticas tradicionais no que se refere à atenção primária à saúde e 85% dessa parcela utiliza plantas ou preparações à base de vegetais. O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia e, no país, o interesse popular e institucional vem crescendo no sentido de fortalecer essa terapêutica. A partir da década de 80, diversos documentos foram elaborados enfatizando a introdução de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção básica no sistema público. Em levantamento realizado pelo Ministério da Saúde do Brasil no ano de 2004, verificou-se que só se utiliza a Fitoterapia em postos de saúde de 116 municípios. Nesse contexto, o Ministério da Saúde preconiza o incentivo às pesquisas que visem ao aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas (BRASIL, MS, 2006).

Os medicamentos fitoterápicos são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997). No Brasil apenas 8% das espécies vegetais da flora foram estudadas em busca de compostos bioativos (GUERRA & NODARI, 2004) e cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (FILHO & YUNES, 1997). Isso deixa claro a importância de pesquisas que avaliam o potencial das espécies vegetais, visto que novos fármacos com propriedades farmacológicas relevantes podem ser descobertos e que um grande número de plantas medicinais utilizadas pela população para o tratamento de enfermidades ainda não foram estudadas para avaliar sua atividade farmacológica.

A indicação do uso de medicamentos fitoterápicos na terapêutica não é substituir medicamentos registrados e comercializados com eficácia já comprovada, mas sim, aumentar o arsenal terapêutico, ofertando medicamentos equivalentes, registrados e com eficácia comprovada (RATES, 2001).

Os fitoterápicos são medicamentos de venda livre e por isso estão diretamente ligados a problemas de automedicação e devem então ser foco importante da orientação farmacêutica, objetivando-se promover o uso racional desses medicamentos (RATES, 2001).

O uso de medicamentos fitoterápicos sem orientação também pode levar a problemas de interações medicamentosas, que ocorrem quando um fármaco interfere na ação de outro ou quando o alimento ou nutriente interfere na ação

de um fármaco. Interações medicamentosas podem ser benéficas, quando um fármaco reduz efeitos adversos ou prolonga a ação de outro, mas também pode ser indesejável quando reduz o efeito de outro fármaco, aumenta a ocorrência de efeitos adversos ou aumenta o custo da terapia, sem aumentar o benefício terapêutico. Um exemplo de interação medicamentosa de fitoterápico descrito na literatura é o *Hypericum perforatum* L., que é utilizado no tratamento da depressão leve a moderada, com perfil de tolerabilidade superior aos antidepressivos sintéticos, e que pode reduzir os níveis séricos de vários fármacos, provavelmente por indução das enzimas hepáticas (citocromo P 450 – isoenzima CYP1A2). O hipérico pode reduzir a concentração plasmática do indinavir, que é inibidor da protease, utilizado por portadores de HIV; da ciclosporina, imunossupressor utilizado após transplante de órgãos; da digoxina, utilizada no tratamento de doenças cardíacas e da sinvastatina, que inibe a enzima HMG-CoA redutase (CORDEIRO, CHUNG & SACRAMENTO, 2005).

## **1.2. Controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos**

O governo federal brasileiro, através do Decreto nº 5,813, de 22 de junho de 2006, aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, buscando garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, sendo necessário a capacitação de profissionais envolvidos neste processo como agrônomos, farmacêuticos e médicos.

No Brasil, muitos programas de Fitoterapia, desenvolvidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), estão vinculados ao Programa Saúde da Família (PSF). Dentre esses programas existe o Programa Farmácias Vivas, que foi o primeiro programa de assistência farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais, com o objetivo de produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis à população (SILVA *et al.*, 2006).

O município de Maracanaú (CE) foi o primeiro a implantar o Programa Farmácias Vivas do Sistema Público de Saúde. Em levantamento feito nesse município verificou-se que a prevalência de fitoterápicos nas prescrições médicas é de 20,6%, sendo afecções respiratórias, cutâneas e *Diabetes mellitus* as principais indicações terapêuticas. Outra observação feita foi que mais da metade das prescrições que continham a Tintura de Mororó (*Bauhinia forficata* L.) também continham medicação alopática hipoglicemiante (SILVA *et al.*, 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução-RDC nº 48 (2004), definindo critérios que deverão ser seguidos pelas indústrias produtoras de medicamentos fitoterápicos no país, a fim de conseguirem o registro de medicamento fitoterápico. Essa legislação busca garantir a qualidade do medicamento ao consumidor. Para isso é exigido a reprodutibilidade dos fitoterápicos produzidos, o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e do medicamento acabado e a comprovação da eficácia e segurança do medicamento fitoterápico.

Considerando então que a eficácia e segurança dos fitoterápicos dependem, dentre outros fatores, da qualidade da matéria-prima vegetal, é

importante obedecer às condições ideais de cultura, colheita, secagem, estabilização, conservação e armazenamento (AMARAL *et al.*, 2003). Poucas são as informações existentes de procedimentos de cultivo e de pós-colheita em plantas medicinais (RADÜNZ *et al.*, 2001). Dentre tais procedimentos inclui-se o processo de secagem, que pode alterar a qualidade da espécie vegetal, pois a presença de quantidade excessiva de água propicia o desenvolvimento de fungos, bactérias, insetos e pode acarretar a hidrólise de constituintes químicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988). Assim, a alta sensibilidade do princípio biologicamente ativo e sua preservação no produto final são os maiores problemas na secagem de plantas medicinais (RADÜNZ *et al.*, 2001).

Por sua própria origem, as plantas estão sujeitas a contaminação por microrganismos provenientes do solo e da água, que podem ser potencialmente patogênicos para o homem. A utilização de plantas para fins terapêuticos, sem garantia de segurança e eficácia, é agravada pela tendência dos consumidores em adquirirem tais produtos, preferencialmente, no comércio varejista, realizado em mercados e feiras livres, onde os mesmos são comercializados indiscriminadamente e sem controle, representando perigo ao consumidor pelo risco de aquisição e utilização de produtos de má qualidade (AMARAL *et al.*, 2003).

Na avaliação da qualidade das plantas medicinais e fitoterápicos é importante também avaliar o teor de princípios ativos. A ANVISA, por meio da Resolução RDC 89/2004 (BRASIL, 2004), publicou uma lista de fitoterápicos de registro simplificado e buscou estabelecer a padronização de marcadores químicos para diversas plantas, além de limite diário para seu uso. A

quantidade de princípios ativos em determinada espécie vegetal é influenciada por fatores tais como fertilidade do solo, umidade, radiação solar, vento, temperatura, herbivoria, poluição atmosférica, poluição do solo, idade da planta, época da coleta e outros fatores. Sendo assim, a observação destes parâmetros no momento da utilização das plantas medicinais ou produção do medicamento fitoterápico é também de fundamental importância para garantir a segurança e eficácia dos fitoterápicos utilizados pela população (MACIEL, PINTO & VEIGA Jr, 2002; BARA *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a qualidade de amostras de *Cissus verticillata verticillata*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Determinar o percentual de massa fresca e massa seca das folhas de *C. verticillata verticillata*.
- Avaliar o processo de secagem do material vegetal em estufa com ventilação forçada.
- Determinar a perda de água por dessecação das folhas secas.
- Determinar a quantidade de cinzas totais.
- Realizar o controle de qualidade de amostras comerciais.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Procedimentos gerais

##### 3.1.1. Coleta e identificação

As folhas de *C. verticillata verticillata* (Fig. 1.1) utilizadas no estudo foram coletadas no bairro Antônio Dias, Ouro Preto, Minas Gerais (latitude: 20° 23' 15.24" S e longitude: 43° 30' 3.56" O) no mês de Julho de 2007, no período da manhã. Confeccionou-se exsicata que foi identificada pelo especialista Dr. Julio Antônio Lombardi, da Unesp - Rio Claro e depositada no Herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (OUPR 20570).



**Figura 1.1:** Folhas de *C. verticillata verticillata*.

### **3.1.2. Processo de secagem**

As folhas coletadas foram selecionadas, passadas em água corrente, dispostas em papel absorvente a fim de retirar o excesso de água e posteriormente colocadas em estufa com ventilação forçada (FABBE modelo 171) à 45°C, até peso constante. A seguir, foram reservadas para maceração em solvente etanol / água 1:1.

### **3.1.3. Preparação do extrato vegetal**

O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata* (EHA) foi preparado através do método de remaceração (SONAGLIO *et al.*, 2004). As folhas secas foram colocadas em solvente água / etanol 1:1 e deixadas em repouso por 72 horas. Após esse período filtrou-se o extrato em gaze. Repetiu-se esse procedimento para extração exaustiva do material vegetal.

Mediu-se o pH do filtrado obtido e em seguida ele foi colocado em evaporador rotatório (Buchi, R114, Suíça) à pressão reduzida.

Após a secagem, o resíduo do material evaporado foi levado ao liofilizador (METAL-LUX, Divisão de vácuo, Brasil). O rendimento da extração foi calculado através da fórmula: rendimento% = (peso extrato seco / peso das folhas) X 100.

## **3.2. Controle de qualidade do material vegetal**

### **3.2.1. Percentual de massa fresca / massa seca**

Folhas inteiras de *C. verticillata verticillata* foram adicionadas em embalagens de papel vazias e levadas à estufa com ventilação forçada.

Procedeu-se à pesagem antes e após a secagem em balança analítica (Sartorius BP 221S). Foram utilizadas seis repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, testes de média ao nível de 5% de significância, utilizando o programa SAEG 2007/UFV.

### **3.2.2. Determinação da perda por dessecação**

A determinação da perda por dessecação pelo método gravimétrico foi realizada de acordo com a metodologia V.2.9., descrita na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988).

Nessa determinação, as folhas secas foram pulverizadas e distribuídas em quatro repetições. Quatro cadinhos de porcelana foram levados à estufa (Magnu's) a 105°C, até peso constante. Depois foram levados ao dessecador e posteriormente pesados. Colocou-se em cada cadinho 2,0 g de pó das folhas.

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, teste de média ao nível de 5% de significância, utilizando o programa SAEG 2007/UFV.

### **3.2.3. Determinação de cinzas totais**

O método foi realizado de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), metodologia V.4.2.4.

Nesse ensaio, as folhas secas foram pulverizadas e distribuídas em quatro repetições com 3,0 g de pó, que foram colocados em cadinhos de

porcelana. O material foi levado à mufla (Proquilabor modelo 400-B) a 450°C, por aproximadamente 30 minutos, até formação total de cinzas.

As pesagens foram realizadas em balança analítica (Sartorius BP 221S) e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão, teste de média ao nível de 5% de significância, utilizando o programa SAEG 2007/UFV.

### **3.3. Controle de qualidade de amostras comerciais de “Insulina vegetal”**

#### **3.3.1. Amostras**

As amostras foram adquiridas no Mercado Municipal da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais (amostra I e II) e em ervanaria da cidade de Viçosa, Minas Gerais (amostra III). Todas estavam especificadas como “Insulina vegetal” e foram adquiridas no mês de setembro de 2007.

#### **3.3.2. Embalagens, análise sensorial e elementos estranhos**

Foram observados os tipos de embalagem, bem como as informações nelas contidas. Os caracteres organolépticos odor, cor e tato foram avaliados. Na análise de matéria estranha, todo o conteúdo das amostras foi separado das impurezas por catação e posteriormente pesados.

#### **3.3.3. Determinação da perda por dessecação**

Nas amostras comerciais de “Insulina vegetal”, a determinação da perda por dessecação foi realizada pelo Método gravimétrico, de acordo com a metodologia V.2.9., descrita na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988).

Nessa determinação, as amostras I, II e III foram pulverizadas separadamente e cada uma foi distribuída em quatro repetições. Os cadinhos de porcelana foram levados à estufa Magnu's a 105°C até peso constante. Depois foram levados ao dessecador e posteriormente pesados. Colocou-se em cada cadinho 2,0 g de pó das folhas.

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica Sartorius BP 221S.

Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, teste de média ao nível de 5% de significância, utilizando o programa SAEG 2007/UFV.

#### **3.3.4. Qualidade microbiológica**

No referente à qualidade microbiológica, foi realizada pesquisa de contaminantes, com contagem de mesófilos aeróbios totais e bolores e leveduras, em placas (SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2007). Pesou-se assepticamente 2,0 g de cada amostra, que foram trituradas e diluídas em 18 mL de água peptonada 0,1%. A diluição obtida correspondeu à diluição  $10^{-1}$ , a partir da qual foram obtidas as demais diluições decimais até  $10^{-5}$ . Na pesquisa de mesófilos aeróbios totais as diluições de cada amostra foram semeadas, em duplicata, utilizando-se a técnica em profundidade, empregando-se o meio PCA "*plate count agar*" fundido. Após a solidificação do agar, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Na pesquisa de bolores e leveduras utilizou-se agar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a 10%. O método empregado foi o de plaqueamento em superfície, com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 28°C por 96 horas. As colônias foram contadas com

auxílio de lupa iluminada e os resultados expressos em UFC/g (unidades formadoras de colônias, por grama).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas permaneceram em estufa ventilada por período de 96 horas até peso constante, tendo rendimento de secagem de 14,3%. Partindo-se de 1889,0 g de folhas frescas, obteve-se 270,0 g de folhas secas. A cor verde inicial das folhas foi preservada após o processo de secagem (Fig. 1.2).



**Figura 1.2:** Aparência das folhas de *C. verticillata verticillata* após secagem em estufa ventilada.

Na avaliação do percentual de água, as folhas chegaram a peso constante depois de permanecer na estufa por 96 horas. O resultado da determinação do percentual de água das folhas está disposto na Tabela 1.1.

**Tabela 1.1:** Comparações das médias (g) e desvio padrão de análises dos diferentes tratamentos de folhas de *C. verticillata verticillata*.

TRATAMENTO	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO ( $\alpha = 5\%$ )	CV (%)
TMF	2,8086 ± 0,09	3,175
TMS	0,4069 ± 0,02	5,844
TPA	85,5214 ± 0,43	0,501
TPMS	14,4786 ± 0,43	2,957
TPC	17,9933 ± 0,84	4,67

Tratamentos: massa fresca (TMF), massa seca (TMS), percentual de água (TPA %), percentual de massa seca (TPMS %) e percentual de cinzas (TPC %).

Os resultados mostraram que as folhas de *C. verticillata verticillata* possuem percentual de água de 85,52% ± 1,96 (Tab. 1.1). Esse alto teor de água leva à necessidade de se realizar secagem eficaz pós-colheita, já que a secagem artificial de plantas medicinais pode trazer vários benefícios, tais como aumento no rendimento dos princípios ativos, bem como redução do tempo necessário para completar o processo de secagem, com conseqüente redução nos custos (RADÜNZ *et al.*, 2001).

Devido ao percentual de 85,52% de água nas folhas da espécie em estudo, os processos de secagem inadequados podem levar à contaminação por fungos e bactérias o que, além de representar riscos devido à produção de substâncias tóxicas, pode acarretar destruição e/ou alteração dos princípios ativos, tornando-se assim o material vegetal impróprio ao consumo (AMARAL *et al.*, 2003).

No ensaio de determinação da perda por dessecação, o pó das folhas permaneceu em estufa por período de 06 horas. Estes resultados, bem como os da determinação de cinzas totais, estão descritos na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2:** Dados do ensaio de determinação da perda por dessecação das folhas de *C. verticillata verticillata* (média (g)  $\pm$  desvio padrão).

TRATAMENTO	MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO ( $\alpha = 5\%$ )	CV (%)
TMS	2,0024 $\pm$ 0,00	0,10
TME	1,7728 $\pm$ 0,01	0,69
TPA %	11,4661 $\pm$ 0,58	5,07

Tratamentos: massa seca (TMS), massa após secagem em estufa (TME) e percentual de água (TPA %)

A fim de evitar a deterioração das plantas medicinais, foi estabelecido o limite de 8 a 14% de umidade residual (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988), que leva à boa preservação da matéria-prima vegetal. Analisando, através do método gravimétrico, o processo de secagem realizado, observou-se que a planta seca continha 11,47%  $\pm$  0,58 de umidade (Tab. 1.2), estando assim dentro da faixa estabelecida pela Farmacopéia Brasileira. Esse dado é fator significativo, pois influencia no processo de conservação que, se aliado a armazenamento adequado, mantém a qualidade da espécie vegetal, estabilidade e preservação de suas propriedades terapêuticas, conforme também relatado nas sementes de camomila (*Chamomilla recutita* L.) (SOUZA *et al.*, 2007).



O percentual de cinzas totais foi de 17,99% ( $0,5408 \pm 0,02$ g de cinzas foram obtidas a partir de  $3,0061 \pm 0,02$ g de folhas secas) (Tab. 1.2). Essa determinação estabelece a quantidade de substância residual não-volátil obtida no processo de incineração (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988). A metodologia é rápida, simples e pode ser facilmente aplicada no controle de qualidade da espécie vegetal seca, permitindo detectar adulterações e evitar a exposição do consumidor ao risco real do uso de material vegetal impróprio ao consumo (AMARAL *et al.*, 2003).

Na preparação do extrato hidroalcoólico de *C. verticillata verticillata* (EHA) foram utilizados 200,0 g de folhas secas e 29,9 L de solvente água / etanol 1:1 (Fig. 1.3). O extrato teve pH = 5,0.



**Figura 1.3:** Aparência do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*.

Após evaporação do solvente em evaporador rotatório, obteve-se extrato com aparência resinosa e odor característico (Fig. 1.4).



**Figura 1.4:** Aparência do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata* após secagem em evaporador rotatório.

Depois do processo de liofilização obteve-se 28,6 g extrato seco (pó na forma de cristais) (Fig. 1.5). O rendimento do processo de extração foi de 10,6% (a partir de 270,0 g de folhas secas obteve-se 28,6 g de extrato seco). O rendimento dos extratos vegetais varia de acordo com fatores relacionados com a planta e com os métodos de extração e líquidos extratores (VASCONCELOS *et al.*, 2007).



**Figura 1.5:** Extrato hidroalcoólico seco de *C. verticillata verticillata*.

Na análise da qualidade das amostras comerciais, todas estavam especificadas como “Insulina vegetal”, mas nenhuma delas continha a identificação botânica (nome científico) e nem alusão às possíveis aplicações terapêuticas da planta, modo de preparo e posologia. A ausência de identificação botânica e de informações quanto ao modo de preparo pode ser causa de uso incorreto pela população.

Todas as amostras encontravam-se dentro do prazo de validade. As amostras I e II estavam em embalagens tipo plástica e a amostra III embalada em papel multifoliado. Apenas a última fazia referências sobre as condições de armazenamento. Nas embalagens das demais amostras havia informações meramente comerciais (Fig. 1.6).



**Figura 1.6:** Amostras comerciais de “Insulina vegetal”.

A espécie vegetal *C. verticillata* (“Insulina vegetal”) possui odor aromático, agradável e forte, cor castanha esverdeada. Os resultados da análise da qualidade organoléptica das amostras, de acordo com a conservação (+) ou alteração (-) de cada caractere estão dispostos na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3:** Caracteres organolépticos das amostras comerciais de “Insulina vegetal”.

AMOSTRA	COR	ODOR	ASPECTO QUEBRADIÇO
I	-	-	+
II	+	-	+
III	+	+	+

Na análise de elementos estranhos, a amostra I teve 12% do peso total em compostos de elementos estranhos (tal como areia, pedregulhos e outras partes do vegetal). Na amostra II apenas 9% do peso total foi constituído de folhas, sendo o restante composto por outras partes do vegetal (caule e gavinhas), o que reprovava a utilização desse material no chá das folhas. A amostra III apresentou percentual insignificante de elementos estranhos, que segundo Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), pode ser de até 2%.

Os teores de umidade residual, obtidos através de "Determinação da perda por dessecação" estão dispostos na Tabela 1.4

**Tabela 1.4:** Teores de umidade (%) das amostras comerciais de “Insulina vegetal”.

AMOSTRA	TEOR DE UMIDADE (%)	CV (%)
	MÉDIAS ± DESVIO PADRÃO ( $\alpha = 5\%$ )	
I	7,1075 ± 0,7387	0,6397
II	6,4175 ± 0,4209	0,3645
III	7,9675 ± 0,7456	0,6457

De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), os teores de umidade preconizados para plantas medicinais e aromáticas está entre 8 e 14%. Assim, apenas a amostra III pode ser considerada dentro dos padrões.

Os resultados da análise microbiológica estão dispostos na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5:** Contaminantes encontrados nas amostras comerciais de “Insulina vegetal”. Unidade: log UFC/g (unidades formadoras de colônias, por grama).

Amostra	Mesófilos aeróbios	Bolors e leveduras
	log UFC/g	
I	6,1	4,6
II	5,8	*
III	4,7	2,5

\* Valor inexpressivo de acordo com a metodologia utilizada

Nenhuma das amostras comerciais se adequou ao valor preconizado, pela Farmacopéia Brasileira IV (1988), para carga de mesófilos (3,7 log UFC/g). Quanto aos resultados de bolors e leveduras, apenas a amostra I (Fig. 1.7) foi considerada fora do padrão (2,7 log UFC/g).



**Figura 1.7:** Bolors e leveduras na amostra I.

A contagem de mesófilos aeróbios detecta no alimento ou na planta medicinal o número de colônias de bactérias aeróbia ou facultativas e mesófilas presentes na forma vegetativa e esporulada. Indica se a limpeza e desinfecção durante o processamento e o armazenamento e transporte foram realizados de forma adequada (SILVA, 2002).

Bolores são fungos filamentosos e multicelulares, podendo estar presentes no solo, no ar, na água e em matéria orgânica em decomposição. A presença de bolores e leveduras em índices elevados pode indicar condições higiênicas deficientes no processamento ou matéria prima contaminada (SILVA, 2002).

Os resultados desse estudo permitiram a avaliação do processamento de matérias-prima, de diferentes origens, e de acordo com os critérios observados, a amostra III, adquirida em ervanária, mostrou qualidade significativamente superior às demais, que foram adquiridas em feira livre (amostras I e II). No entanto, os altos valores encontrados na carga de mesófilos aeróbios indicaram que as plantas foram expostas a condições de higiene precárias durante o processamento, tornando esses produtos impróprios ao consumo humano, revelando, portanto, a necessidade de fiscalização que garanta aos consumidores a qualidade das plantas medicinais.

É necessário que todo o processamento do vegetal seja realizado em condições extremamente higiênicas a fim de se evitar a contaminação microbiana (CARVALHO & LIMA, 2002).

## 5. CONCLUSÃO

As folhas de *C. verticillata verticillata* possuem alto teor de água, necessitando assim, de um processo eficaz de secagem visando evitar a deterioração do material vegetal. A secagem em estufa de ventilação forçada, a temperatura de 45°C, foi eficaz, proporcionando folhas com teor de umidade de acordo com os valores preconizados pela Farmacopéia Brasileira.

As amostras comerciais de “Insulina vegetal” tiveram altos valores na carga de mesófilos aeróbios, inviabilizando seu uso pela população. Esse resultado, indica a importância da fiscalização do processamento de chás, a fim de se evitar o uso de material impróprio ao consumo.

## CAPÍTULO 2

### ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Cissus*

#### *verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Flavonóides

Os flavonóides, um dos maiores grupos de metabólitos secundários dos vegetais, pertencem à classe dos polifenóis, substâncias que possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados ou seus derivados (ésteres, éteres, glicosídeos e outros) (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004; KAMALAKKANNAN & PRINCE, 2006; HAVSTEEN, 2002). Eles são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Nos vegetais os flavonóides possuem as funções de: proteção contra raios UV, insetos, fungos, vírus e bactéria; atração de animais polinizadores; ação antioxidante; controle da ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004). Podem ser utilizados como marcadores taxonômicos, auxiliando a identificação botânica (HAVSTEEN, 2002).

A irradiância é um fator crucial no desenvolvimento e crescimento dos vegetais (SOUZA, De PAULA & FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2004). A radiação UV-B é absorvida nas folhas por pigmentos complexos formados por flavonóides. Há evidências de que plantas submetidas à radiação UV-B artificial



promovem mudanças nas rotas sintéticas dos flavonóides, alterando suas concentração (DÔRES, 2007). Em massas celulares e tecidos cultivados *in vitro* de *Hypericum perforatum* L. ocorreram baixos níveis de flavonóides, possivelmente devido às características de baixa luminosidade e radiação do experimento (MACHADO, ASTARITA & SANTARÉM, 2007).

Os polifenóis de baixo peso molecular, entre eles flavonóis, flavonas e isoflavonas, têm função de proteção contra o ataque de herbívoros (DÔRES, 2007).

Plantas expostas a estresse hídrico severo protegem-se sintetizando antioxidantes como flavonóides, carotenóides, ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol e glutathione; e aumentando o teor de enzimas antioxidantes como peroxidases, superóxido dismutase e catalase (CARVALHO *et al.*, 2003).

Em um experimento realizado com cultura de *Coffea arabica* L. observou-se que a síntese de fenóis teve tendência inversa à temperatura, ou seja, o aumento da temperatura diminui os teores de fenóis (SALGADO, 2004).

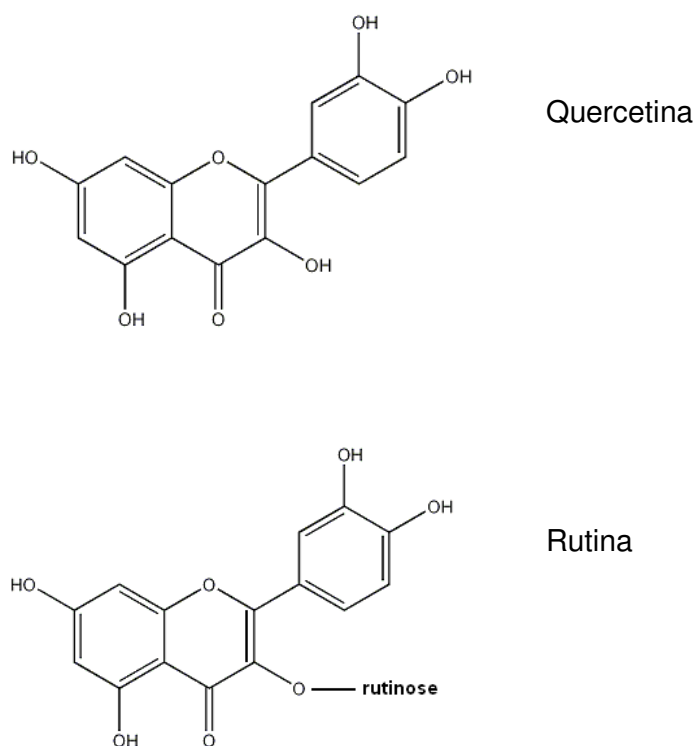
Existem mais de 6000 flavonóides e, devido a esse grande número, eles são agrupados em classe de acordo com suas características químicas e biossintéticas (Tab. 2.1) (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

**Tabela 2.1:** Classe de flavonóides e algumas características conhecidas.

<b>Classes</b>	<b>Número aproximado de estruturas conhecidas</b>	<b>Características</b>
Flavonas, flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	1660	Co-pigmentação em flores; proteção contra raios UV nas folhas.
<i>C</i> -heterosídeos	303	
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul.
Chalconas	197	Pigmentação amarela.
Auronas	29	Pigmentação amarela.
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes frequentemente em tecidos de madeiras.
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo.
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo.
Flavanas, leucoantocianidinas e protoantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes.
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas.
Neoflavonóides	70	
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas.
Outras estruturas	100	

Fonte: ZUANAZZI &amp; MONTANHA, 2004.

Com grande frequência, os flavonóides são encontrados nos vegetais conjugados com açúcares. Estima-se que na dieta humana a ingestão diária de flavonóides é de 1-2 g, sendo a quercetina e a rutina (Fig. 2.1) os flavonóides consumidos em maior quantidade. A absorção dos flavonóides quando ligados à molécula de açúcar é maior do que quando não estão conjugados com açúcares. Estudos demonstraram que a quercetina tem absorção de 24% e a rutina tem absorção de 52% (HAVSTEEN, 2002 & KAMALAKKANNAN, PRINCE, 2006). A absorção dos flavonóides ocorre principalmente no intestino delgado (SAUTTER, 2003).



**Figura 2.1:** Estrutura química da quercetina (aglicona) e rutina (heterosídeo).

Dentre as atividades farmacológicas atribuídas aos flavonóides estão atividade hipoglicemiante, antioxidante, antiviral, antiinflamatória, antitumoral, sobre a permeabilidade capilar e hormonal (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004; AHMAD *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2002; DÔRES, 2007).

Os flavonóides atuam na *Diabetes mellitus*, aumentando a liberação de insulina das ilhotas de Langerhans de forma dependente da concentração do flavonóide (NEGRI, 2005); estimulando os efeitos da insulina nas células através do mecanismo de segundo mensageiro (por exemplo influenciando a proteína fosfofrutoquinase); melhorando as desordens no metabolismo lipídico, inibindo o processo inflamatório causado por radicais livres e inibindo a aldose redutase (HAVSTEEN, 2002).

A avaliação *in vitro* demonstrou que o flavonóide kaempferol, nas concentrações de 0,5; 5,0 e 10,0 µg/ml, inibiu a glicosilação da hemoglobina em 10%, 12% e 15% respectivamente (ASGARY *et al.*, 1999).

O extrato metanólico dos estames de *Nelumbo nucifera*, que possui alto teor de flavonóides, inibiu a aldose redutase em ratos. A aldose redutase é a principal enzima da via poliol, onde a glicose é convertida em sorbitol. Na diabetes, os altos níveis de glicose promovem aumento na produção de sorbitol. Nos pacientes diabéticos o acúmulo de sorbitol nas lentes oculares pode resultar em cataratas; nas hemácias, o sorbitol desloca o 2,3-difosfoglicerato reduzindo a habilidade das hemácias em carregar O<sub>2</sub> e a elevação do sorbitol nos nervos periféricos está associada com a neuropatia periférica (LIM *et al.*, 2006).

## **1.2. Atividade Antioxidante**

### **1.2.1. Radicais livres**

Os radicais livres são substâncias altamente reativas formadas endogenamente no organismo humano, que, apesar de possuírem sua função fisiológica, podem causar lesão celular (GALIZIA & WAITZBERG, 2001). Eles surgem quando elétrons do último orbital de um átomo ficam desemparelhados por ganho ou perda de um elétron. Essa transferência de elétrons ocorre nas reações de oxirredução. O oxigênio molecular ( $O_2$ ) é a principal fonte de radicais livres na célula (FILHO, 2004).

Os principais alvos celulares dos radicais livres são proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Nas células existem enzimas com a função de neutralizar o efeito oxidante dos radicais livres. A superóxido dismutase catalisa a reação do radical superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , a catalase promove a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ ; a glutathione peroxidase catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis pela conversão da glutathione reduzida a glutathione oxidada; a glutathione reduzida protege as células da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, oxônio, radiação e luz ultravioleta (PEDRIALI, 2005).

### **1.2.2. Radicais livres na patogênese da *Diabetes mellitus* e doenças cardiovasculares**

Os danos oxidativos irreversíveis causados por radicais livres estão associados ao desenvolvimento de doenças degenerativas, tais como: aterosclerose, Doença de Parkinson, de Alzheimer, distúrbios cardiovasculares, câncer e diabetes (UCHÔA *et al.*, 2007).

Na patogênese da *Diabetes mellitus* tipo 1, causada por destruição auto imune das células  $\beta$ , o infiltrado inflamatório mediado por células T antígeno específicas leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), superóxidos, radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), óxido nítrico (NO) e citocinas pró inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interferon (IFN). Interações sinérgicas entre ROS e essas citocinas levam à destruição das células  $\beta$  pancreáticas. Isso ocorre também porque as células das ilhotas pancreáticas tem sensibilidade aumentada à ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (PIGANELLI, *et al.*, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão associadas a disfunções cardiovasculares tais como hipertensão, aterosclerose, doenças cardíacas isquêmicas e falência cardíaca congestiva. ROS regulam a função vascular modulando o crescimento celular, apoptose, migração, inflamação, secreção e produção de proteínas da matriz extracelular. O estresse oxidativo, gerado pela descompensação no balanço redox, entre pró-oxidantes e antioxidantes, está associado a danos oxidativos e à produção de mediadores de inflamação e injúria vascular em muitas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, hiperlipidemia e *Diabetes mellitus* (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004).

O radical hidroxila leva ao aumento da resposta a Ang II na aorta torácica em ratos. Esta resposta vascular pode ser diminuída com terapia antioxidante, diminuindo assim as complicações vasculares na hipertensão (DESHMUKH, 2007).

### **1.2.3. Antioxidantes**

As substâncias com propriedades antioxidantes protegem o organismo dos radicais livres e assim retardam ou previnem o processo de doenças ao inibirem a iniciação ou propagação da reação de oxidação em cadeia (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2007).

Os fármacos antioxidantes podem ser utilizados como auxiliares no tratamento de várias doenças. Além disso, o uso de produtos naturais como terapia medicamentosa tem uma perspectiva importante no desenvolvimento de novos fitoterápicos para o tratamento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, como por exemplo, a diabetes e suas complicações. (OLIVEIRA *et al.*, 2007 e HELDWEIN *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante de um extrato vegetal está diretamente ligada à sua quantidade de compostos fenólicos totais. Quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante (SINGH, CHIDAMBARA MURTHY & JAYAPRAKASHA, 2002).

Nos vegetais os compostos fenólicos encontrados podem ser: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmicos), cumarinas, flavonóides, estilbenos taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devido

às suas propriedades redutoras e sua estrutura química. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático (SOUSA, 2007). Eles atuam como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (ROS), além de reduzirem e quelarem íons férricos que agem como catalisadores na peroxidação lipídica (ANDRADE *et al.*, 2007).

Um dos métodos mais utilizados para determinar, *in vitro*, a atividade antioxidante em extratos vegetais é a avaliação da atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Por ação de um antioxidante o DPPH é reduzido, e esta reação pode ser monitorada pelo decréscimo da absorvância. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, maior a sua atividade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Segundo SILVA, *et al.* (2007), na avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, a CE<sub>50</sub> (µg/mL) do flavonóide quercetina é 7,67± 3,6. Na avaliação da atividade antioxidante em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o flavonóide quercetina aumentou a sobrevivência da levedura, após estresse oxidativo, em 51,30% (SOARES, ANDREAZZA & SALVADOR, 2005).

Na espécie *Vitis vinifera* (uva), os compostos fenólicos presentes inibiram, *in vitro*, a oxidação do LDL-colesterol humano (JAYPRASKA, SINGH & SAKARIAH, 2001). Já a fração acetato de etila dos talos de *Cissus quadrangularis* (L.), na concentração de 100 ppm, mostrou 64,8% de atividade antioxidante no ensaio de beta-caroteno e 61,6% no método de DPPH. Esses dados são relevantes devido ao fato de que *Vitis vinifera*, Vitaceae, pertence à



mesma família da *C. verticillata*, e *Cissus quadrangularis* pertencem ao mesmo gênero. Isso enfatiza a importância da avaliação da atividade antioxidante do extrato das folhas de *C. verticillata verticillata*.

## **2. OBJETIVO**

Analisar o perfil cromatográfico e avaliar o potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico e das frações das folhas de *C. verticillata verticillata*.

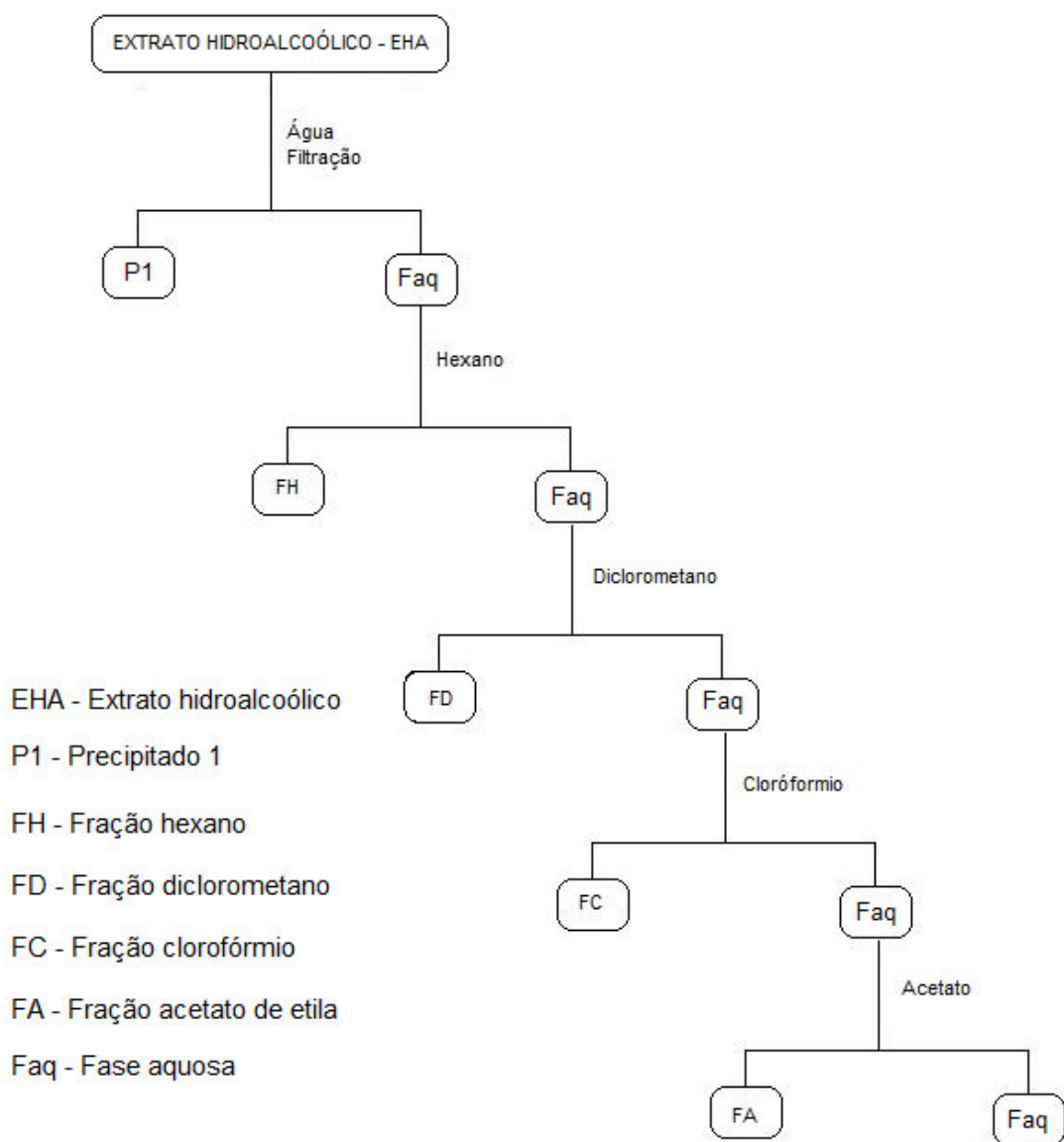
### **2.1. Objetivos específicos**

- Fracionar o extrato hidroalcoólico.
- Obter o perfil cromatográfico por CLAE.
- Quantificar compostos fenólicos totais.
- Determinar atividade antioxidante pelo método do DPPH.

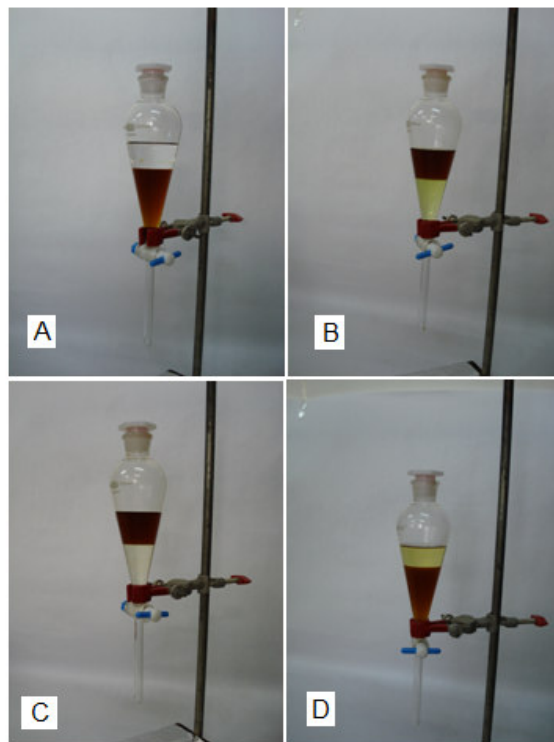
## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Fracionamento do extrato hidroalcoólico**

O extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata* (EHA) foi fracionado através de partição líquido-líquido. Para isso, dissolveu-se o EHA em água destilada, uma parte do extrato foi insolúvel em água, formando o precipitado 1 (P1). Com fase aquosa iniciou-se a partição utilizando os solventes hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila, formando respectivamente as frações FH, FD, FC e FA (Figs. 2.2 e 2.3). As frações obtidas foram utilizadas na obtenção do perfil cromatográfico por CLAE, avaliação da atividade antioxidante e antifúngica.



**Figura 2.2:** Esquema do fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*.



**Figura 2.3:** Fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*, com hexano (A), diclorometano (B), clorofórmio (C) e acetato (D).

### 3.2. Perfil cromatográfico por CLAE

O perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração acetato de etila (FA) de *C. verticillata verticillata* foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As separações cromatográficas foram realizadas em coluna de fase reversa Symnethy C<sub>18</sub> (4,6 X 75 mm, 3,5 µm). O equipamento foi um cromatógrafo líquido Waters 2695.

A eluição por gradiente teve como fase móvel metanol e água. As condições 1 e 2 estão dispostas nas Tabela 2.2 e 2.3 respectivamente.

**Tabela 2.2:** Gradiente da mistura de MeOH-H<sub>2</sub>O (condição 1) utilizado na CLAE do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*.

Solventes (%)	Tempo de eluição (min)
50 A + 50 B	0
100 A + 0 B	25
100 A + 0 B	30
50 A + 50 B	32

**Tabela 2.3:** Gradiente da mistura de MeOH-H<sub>2</sub>O (condição 2) utilizado na CLAE da fração acetato de etila das folhas de *C. verticillata verticillata*.

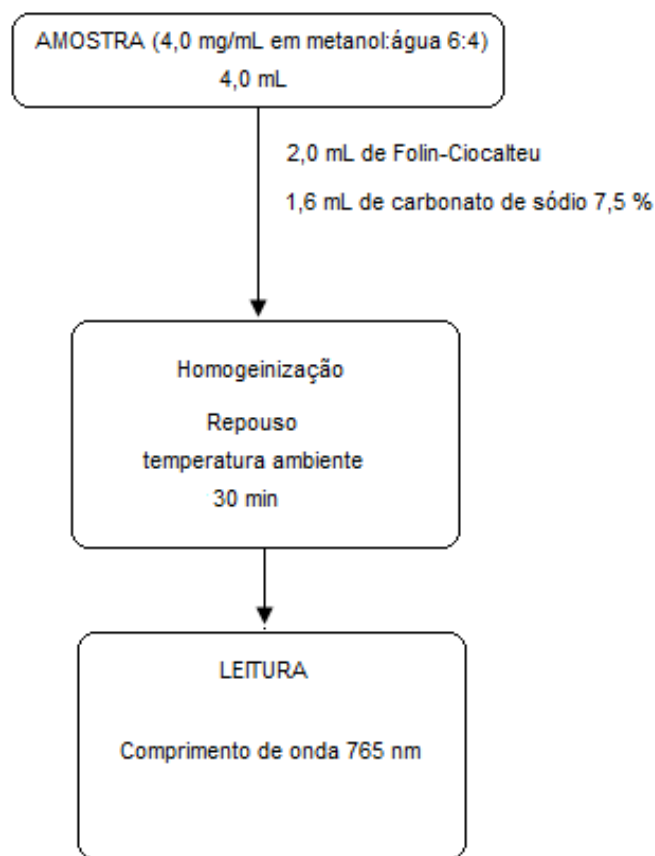
Solventes (%)	Tempo de eluição (min)
30 A + 70 B	0
70 A + 30 B	20
70 A + 30 B	25
30 A + 70 B	27

O fluxo foi de 1,0 mL/min, o volume da amostra injetado foi de 20,0 µL, à temperatura de 25°C. A identificação dos compostos foi feita com espectros obtidos entre 200 e 800 nm pelo detector de arranjo de diodos.

### 3.3. Quantificação de compostos fenólicos totais

Para determinar a concentração de compostos fenólicos totais foram misturados 0,4 mL de amostra (4,0 mg/mL) dissolvido em mistura metanol/água (6:4) com 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Cromoline) e 1,6 mL de solução de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi homogeneizada e deixada

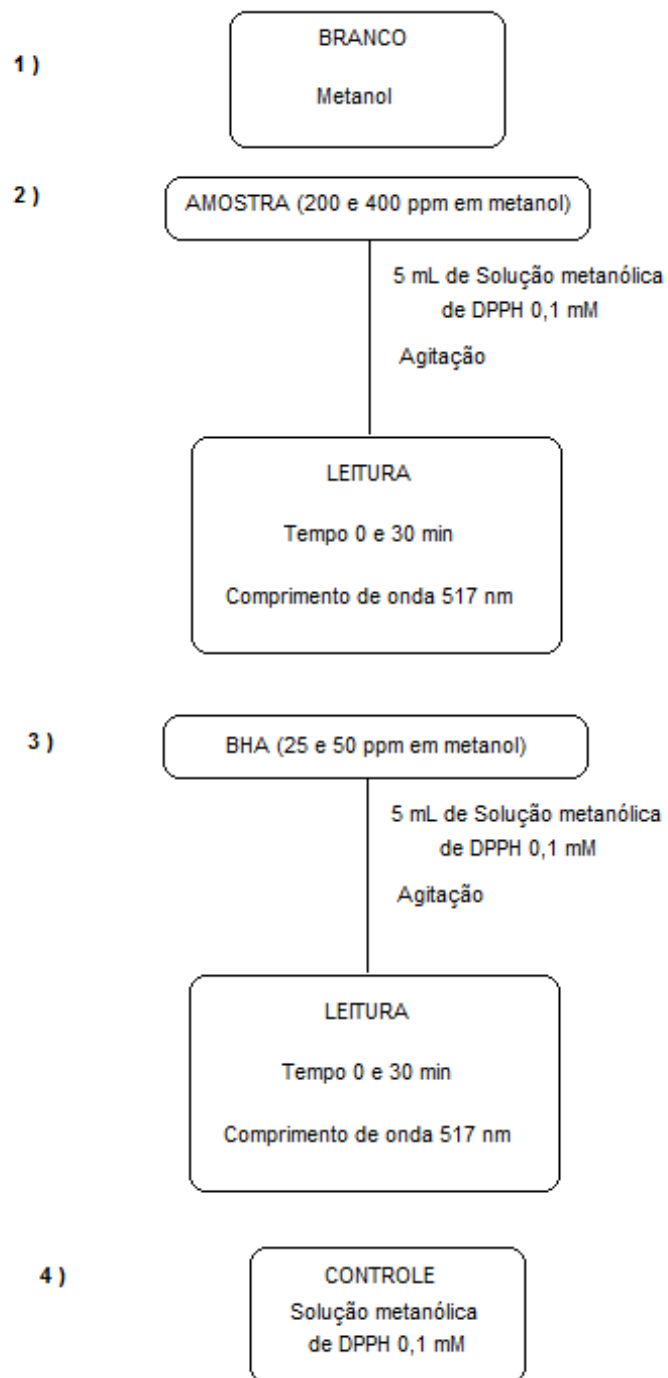
em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Femto® na absorvância de 765 nm (Fig. 2.4) (SINGH, CHIDAMBARA MURTHY & JAYAPRAKASHA, 2002). A curva padrão foi feita nas mesmas condições substituindo os extratos por ácido tânico PA nas concentrações 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/mL. Cada determinação foi realizada com quatro repetições e os resultados expressos como equivalentes do ácido tânico.



**Figura 2.4:** Esquema da determinação de compostos fenólicos totais.

### **3.4. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH**

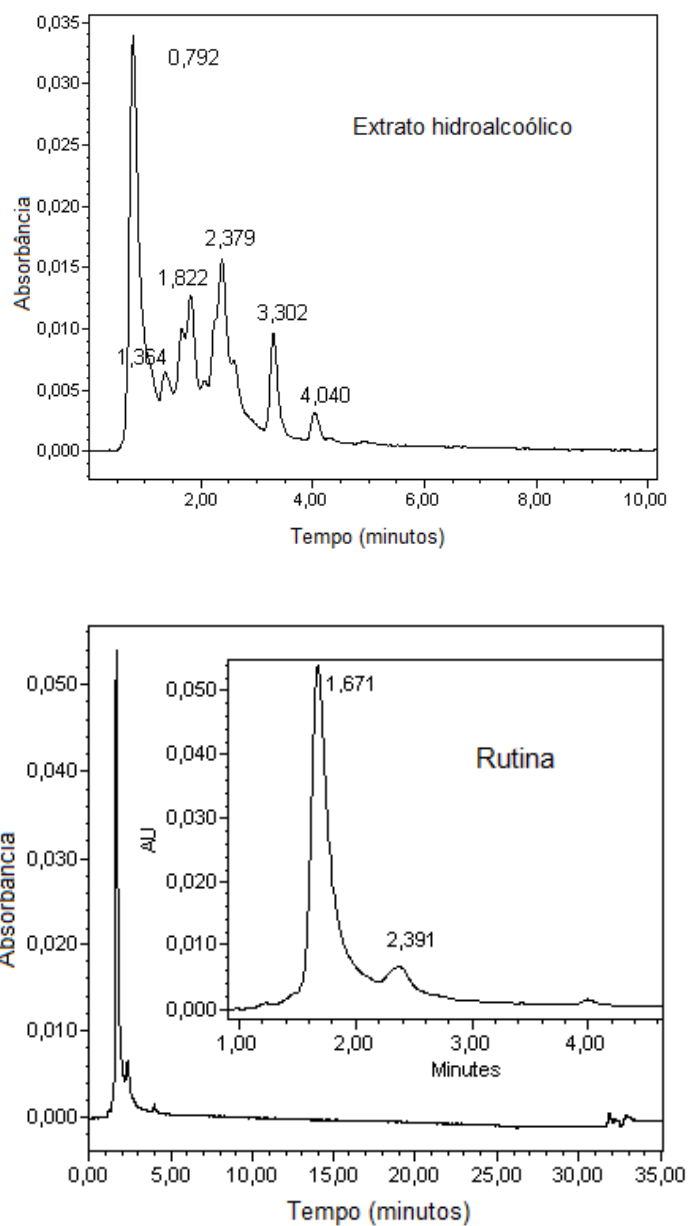
Diferentes concentrações de amostra (200 e 400 ppm), em metanol, foram misturadas com 5 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM. O butilhidroxianisol (BHA) foi utilizado para comparação da atividade antioxidante. Para isso, BHA nas concentrações de 25 e 50 ppm foram misturados com 5 mL de solução metanólica de DPPH 0,1 mM. Os tubos foram agitados e a leitura foi realizada nos tempo 0 e 30 minutos. O controle foi preparado utilizando-se apenas a solução metanólica de DPPH 0,1 mM. O metanol foi utilizado como branco. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm (Fig. 2.5). A porcentagem da atividade antioxidante foi calculada usando a fórmula:  $\% \text{ AAT} = (\text{Abs controle} - (\text{Abs amostra} / \text{Abs controle})) \times 100$  (SINGH, CHIDAMBARA MURTHY & JAYAPRAKASHA, 2002). Todas as determinações foram realizadas em quatro repetições.



**Figura 2.5:** Esquema da determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH.

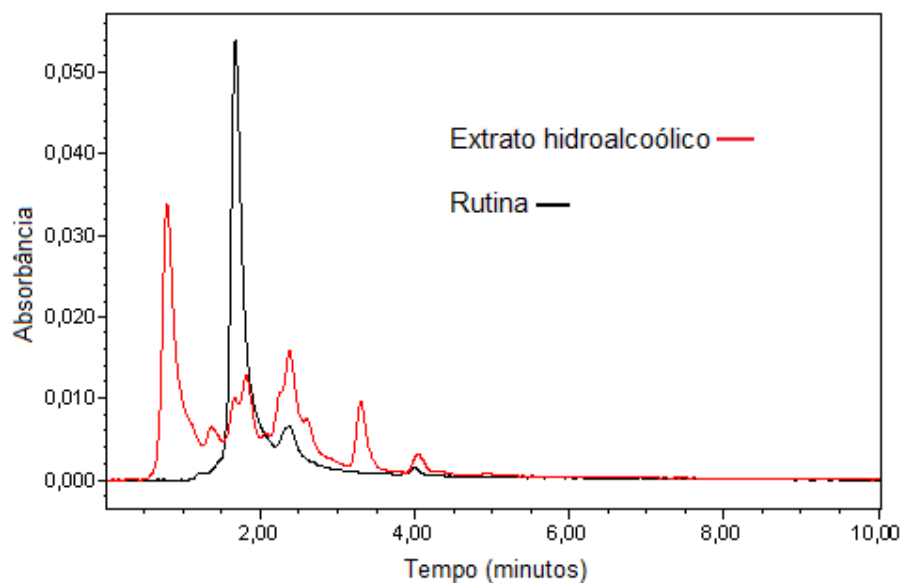
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do cromatograma do extrato hidroalcoólico (condição 1), pode-se detectar a presença do flavonóide rutina (Fig. 2.6 e 2.7).



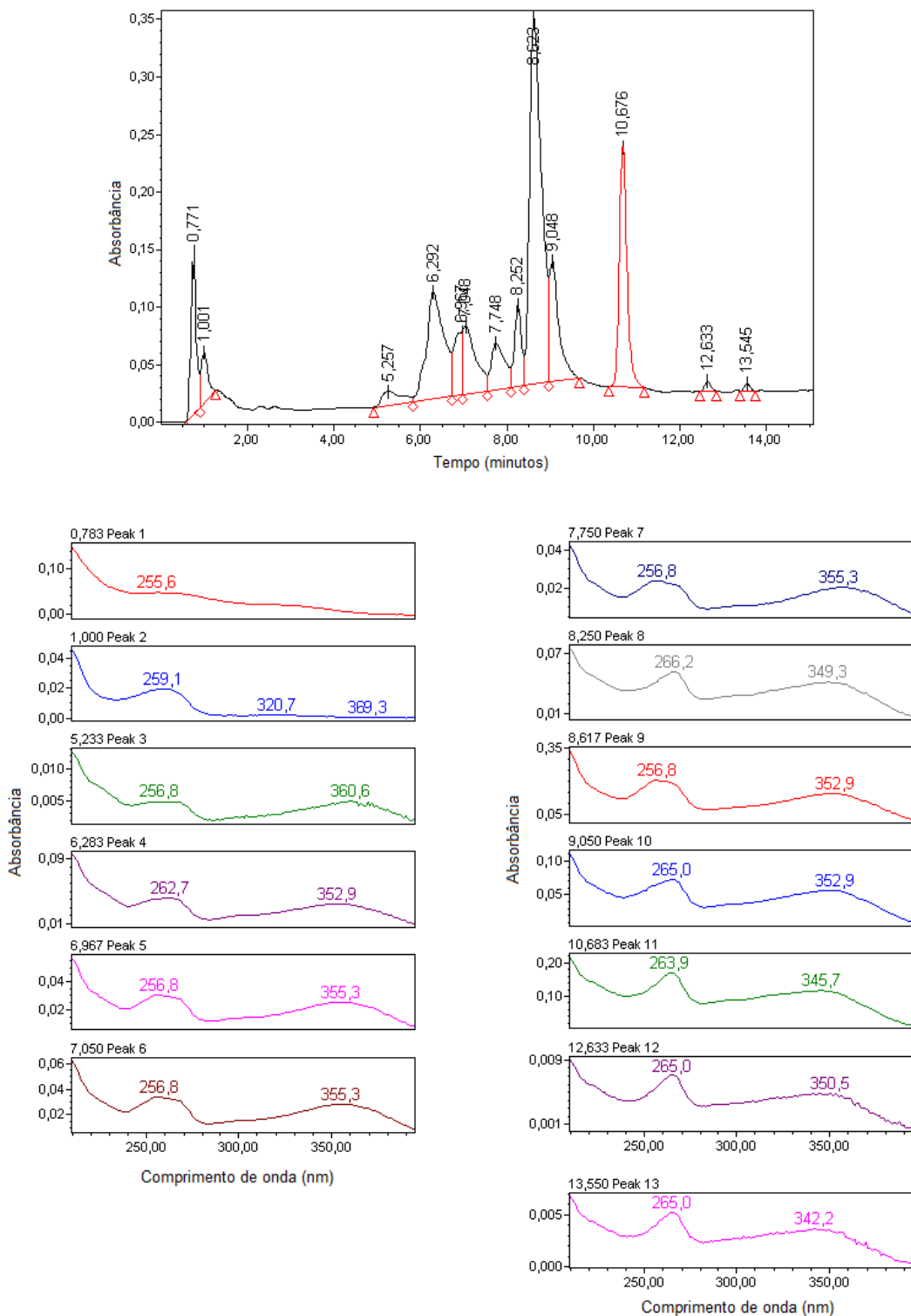
**Figura 2.6:** Cromatograma do extrato hidroalcoólico e do flavonóide rutina (condição 1) à 359,6 nm.





**Figura 2.7:** Sobreposição dos cromatogramas do extrato hidroalcoólico e do flavonóide rutina (condição 1) à 359,6 nm.

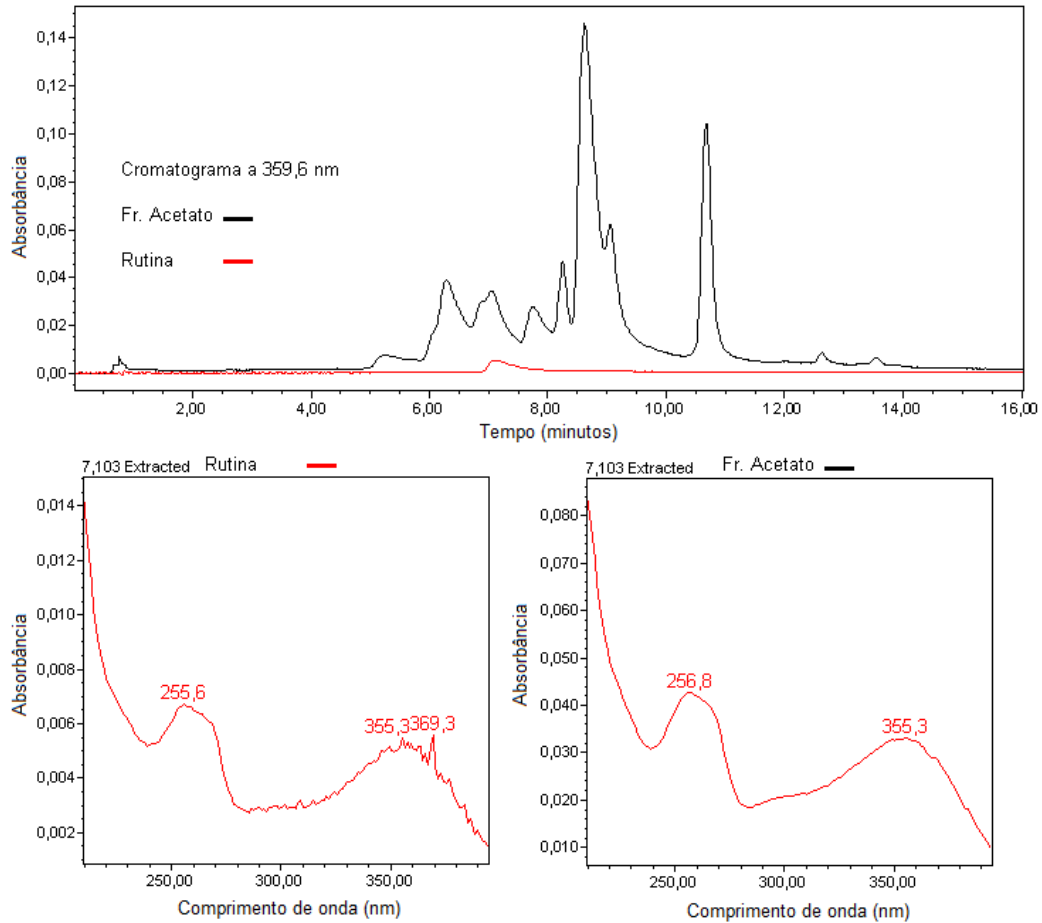
No cromatograma da fração acetato de etila, obtido utilizando a condição 2, foi possível verificar a presença de picos com absorção UV nos comprimentos de onda entre 250 e 350 nm (Fig. 2.8). Essa faixa de absorção é característica de flavonóides (BELTRAME *et al.*, 2001; VOIGT & BORNSCHEIN, 1979).



**Figura 2.8:** Cromatograma da fração acetato de etila (condição 2) a 359,6 nm e espectros ultravioleta dos picos.

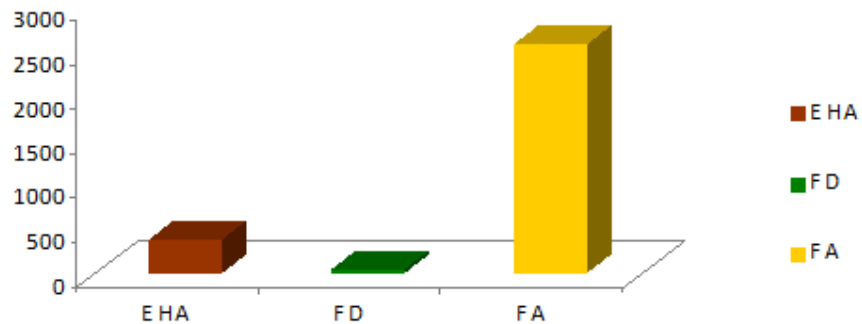
Quando se comparou, nas mesmas condições experimentais, o cromatograma da fração acetato de etila com o do flavonóide rutina (Fig. 2.9), pode-se verificar, através do tempo de retenção (7,10 minutos) a presença da rutina na fração acetato de etila das folhas de *C. verticillata verticillata*.

A rutina possui várias atividades farmacológicas descritas, dentre elas, atividade hipoglicemiante, antibacteriana, antitumoral, antiinflamatória, antidiarréica, antiúlcera, antimutagênica, vasodilatadora e protetora do miocárdio (KAMALAKKANNAN & PRINCE, 2006).



**Figura 2.9:** Sobreposição dos cromatogramas da fração acetato de etila de e do flavonóide rutina à 359,6 nm sobrepostos.

O resultado da quantificação de compostos fenólicos para EHA, FD e FA foram respectivamente 381,0, 52,0 e 2574,0 mg/mL em equivalentes de ácido tânico (Fig. 2.10). A equação da curva padrão de ácido tânico foi  $y = 0,002 + 0,060x$  e o  $R^2 = 0,977$ .



**Figura 2.10:** Teor de compostos fenólicos expressos em equivalentes de ácido tânico do extrato hidroalcoólico (EHA), fração diclorometano (FD) e fração acetato de etila (FA).

Na fração acetato de etila (FA) da espécie *C. verticillata verticillata* a concentração de compostos fenólicos é significativamente maior do que no extrato hidroalcoólico e na fração clorofórmio (Fig. 2.10).

A espécie *Acacia podalyriifolia* que contém compostos fenólicos apresentou maior concentração destes compostos na fração acetato de etila (ANDRADE *et al.*, 2007).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos. Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos. Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos,

ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para os radicais livres (ROESLER *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos na determinação, pela metodologia do DPPH, da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHA), da fração diclorometano (FD) e da fração acetato de etila (FA) estão dispostos na Tabela 2.4. O BHA foi utilizado como padrão.

**Tabela 2.4:** Porcentagem da atividade antioxidante pela metodologia do DPPH, do extrato hidroalcoólico (EHA), fração dicloro (FD), fração acetato (FA) e BHA.

AMOSTRAS (ppm)	TEMPO 30 min
	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO ( $\alpha = 5\%$ )
EHA (200)	6,11% ± 1,59
EHA (400)	11,68% ± 0,78
FD (200)	14,22% ± 2,66
FD (400)	20,24% ± 1,96
FA (200)	26,84% ± 3,73
FA (400)	70,06% ± 3,66
BHA (25)	23,26% ± 4,64
BHA (50)	73,55% ± 1,23

Pode-se verificar que entre as amostras testadas nesse estudo a fração acetato de etila (FA) das folhas de *C. verticillata verticillata* possui a maior concentração de compostos fenólicos e também foi a que apresentou maior atividade antioxidante pela metodologia do DPPH. Essa maior concentração de compostos fenólicos é resultado do processo de fracionamento que concentrou

as substâncias fenólicas nessa fração devido a maior afinidade pelo solvente acetato de etila.

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos e nas plantas medicinais são encontrados uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

A espécie *Cissus quadrangularis*, que possui compostos fenólicos, apresentou atividade antioxidante *in vitro* na metodologia do DPPH (OBEN *et al.*, 2007).

Na avaliação da atividade antioxidante, através da metodologia do DPPH, de tinturas vegetais vendidas em farmácias de manipulação a tintura de *Ginkgo biloba* foi utilizada como referencia devido a sua alta atividade antioxidante, sendo sua  $CE_{50}$  igual a 38,91  $\mu\text{g/mL}$ . A tintura de própolis apresentou uma atividade antioxidante bem próxima da atividade do ginkgo biloba, sendo sua  $CE_{50}$  de 40,16  $\mu\text{g/mL}$ . Isso se deve ao fato de que a própolis, material resinoso elaborado pelas abelhas a partir de brotos, cascas e outras partes do tecido vegetal de árvores e plantas, de um modo geral, é constituído principalmente por flavonóides, ácidos aromáticos e seus derivados (VICENTINO & MENEZES, 2007).

Os chás são bebidas populares e fontes significativas de compostos fenólicos, são considerados importantes integrantes das dietas devido ao seu alto potencial antioxidante. Os extratos aquosos da macela, alecrim, erva-mate e malva apresentaram atividade antioxidante superior a 97% em teste *in vitro* (ASSOLINI *et al.*, 2006).

Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixa concentração, sejam capazes de impedir, retardar e prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável. A avaliação da atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos mostrou que a quercetina tem porcentagem de inibição, mesmo em menor concentração quando comparada à ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogênico, catequina e rutina. Isso ocorre devido à quercetina ser um flavonol com cinco hidroxilas fenólicas reativas, sendo que duas destas estão ligadas ao anel B (anel que possui maior atividade redutora), apresentando estabilidade por ressonância. A rutina possui uma estrutura semelhante à da quercetina, mas com uma substituição glicosídica em uma das hidroxilas, por essa razão, apresenta uma menor atividade antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Na avaliação da atividade antioxidante pela metodologia do DPPH, o alcalóide montanina teve um percentual de atividade de 36% na concentração de 3,5 µg/mL. Já foi descrito a presença de alcalóides na espécie *C. verticillata verticillata* (CASTILHOS *et al.*, 2007; BARBOSA *et al.*, 2002).



## 5. CONCLUSÃO

Foi identificado através do perfil cromatográfico por CLAE o flavonóide rutina na fração acetato de etila das folhas de *C. verticillata verticillata*.

A fração acetato de etila teve a maior atividade antioxidante pela metodologia do DPPH e também a maior concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido tânico.

Futuros estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar a atividade antioxidante da fração acetato de etila podem levar a identificação de novos compostos antioxidantes que poderão ser utilizados na terapêutica de doenças como a DM e hipertensão arterial.

## CAPÍTULO 3

### ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E.

#### Jarvis subsp. *verticillata*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Diabetes mellitus* e infecções fúngicas

O paciente diabético pode apresentar infecções mais freqüentes e mais severas quando comparados a indivíduos não-diabéticos (GUGGENHEHNER *et al.*, 2000). Na *Diabetes mellitus* ocorre diminuição na quimiotaxia dos neutrófilos, essa disfunção pode estar relacionada à deficiência de mieloperoxidase (MPO), uma enzima lisossômica que catalisa a reação entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e íons cloreto para formar hipocloreto, que é extremamente bactericida. Essa deficiência costuma ocorrer com maior freqüência em pacientes diabéticos tipo 1 e *in vitro* a responsividade dos neutrófilos pode ser restaurada incubando-os com insulina (SCHECHTER & GUIMARÃES-WALKER, 2004; GUYTON & HALL, 2006).

Observou-se experimentalmente que na *Diabetes mellitus* ocorre, além da depressão da atividade dos neutrófilos, menor eficiência da imunidade celular, alteração dos sistemas antioxidantes e menor produção de interleucinas. Esses achados podem estar relacionados à maior ocorrência de certas infecções (ROCHA *et al.*, 2002).

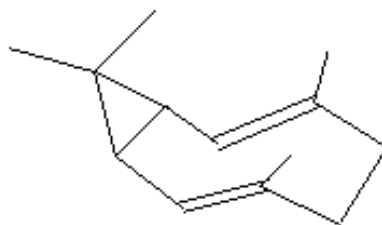
A *Diabetes mellitus* se associa ao maior risco de infecções urinárias, e *Candida* spp. é o principal gênero envolvido. Dentre as espécies desse gênero *Candida albicans* é a principal responsável pelas infecções fúngicas

(SCHECHTER & GUIMARÃES-WALKER, 2004). Existem outras espécies inseridas no gênero *Candida* como *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* que também podem estar envolvidas na etiologia da candidíase (LIMA *et al.*, 2006).

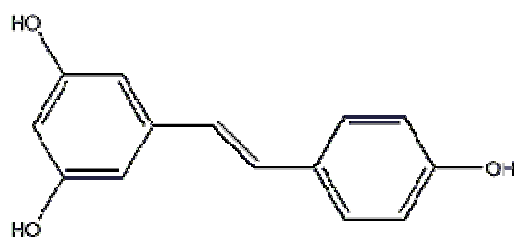
## **1.2. Ação antifúngica**

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento e considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados (LIMA *et al.*, 2006), torna-se importante a busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal que possam auxiliar a terapêutica.

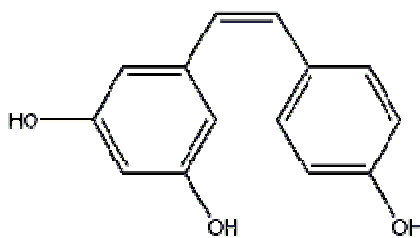
A atividade antifúngica de *C. verticillata* foi relatada nas frações clorofórmio e acetato de etila que continham respectivamente o sesquiterpenóide bicilogermacreno e resveratrol (3, 4', 5 trihidroxiestilbeno) (Fig. 3.1) (SILVA *et al.*, 2006).



Biciclogermacreno



Trans-resveratrol



Cis-resveratrol

**Figura 3.1:** Estrutura química de biciclogermacreno e resveratrol.

Os óleos essenciais são constituídos principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos e compostos aromáticos de baixo peso molecular (ARAÚJO, LORDELLO & MAIA, 2001). Eles também podem receber a denominação de óleos voláteis e são, de forma geral, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Nos vegetais, os óleos essenciais, podem atuar na proteção contra infestantes e farmacologicamente

possuem atividade anti-séptica, inibindo o crescimento de várias bactérias e fungos (SIMÕES & SPITZER, 2004).

O óleo essencial de *Piper cernuum* e *P. regnellii* possui em sua composição o biciclogermacreno que mostrou atividade antimicrobiana (CONSTANTIN *et al.*, 2001; CYSNE *et al.*, 2005). Em *Calea clematidea*, o óleo essencial contém germacreno B, que possui atividade antifúngica (FACH *et al.*, 2002).

O resveratrol possui atividade contra dermatófitos e bactérias da pele em humanos (SILVA *et al.*, 2007; SAUTTER, 2003).

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata* e suas frações.

### **2.1. Objetivos específico**

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Preparo das amostras**

O extrato hidroalcoólico (EHA), precipitado 1 (P1), e as frações hexano (FH), diclorometano (FD), clorofórmio (FC) e acetato de etila (FA)

constituíram as amostras de análise. Mentol (M) e os antifúngicos cetoconazol (Janssen-Cilag) e fluconazol (Pfizer) os controles de referência.

### **3.2. Diluição das amostras**

Todas as amostras foram solubilizadas em DMSO (Merck), na concentração de 1% do volume da solução mãe, à exceção do fluconazol que foi diluído em água destilada esterilizada. A partir dessas soluções foi procedida à preparação de diluições seriadas das amostras em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) conforme a metodologia empregada (CLSI – documento M27-A2).

Para a utilização do meio RPMI, adicionou-se 10,4 g de liofilizado, 34,4 g de MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) e 1000 ml de água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi esterilizado por filtração, utilizando-se membrana de nitrocelulose de poro 0,22 µm (Millipore). Este meio foi mantido em frasco esterilizado, conservado sob refrigeração (2 - 8° C).

As concentrações testadas corresponderam às faixas intervalares entre 1 a 512 µg/mL para amostras e mentol; 0,015 a 8 µg/mL para cetoconazol e 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol.

### **3.3. Microorganismos utilizados**

Foram utilizados as espécies *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida tropicalis* ATCC 750 pertencentes ao Laboratório de Micologia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

No crescimento e manutenção das culturas de *C. albicans*, *C.krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi utilizado o meio Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai – Índia).

As amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em tubos contendo meio Sabouraud sólido e incubadas a 28°C durante 24 horas. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente com alça esterilizada e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% estéril. O inóculo foi preparado com cerca de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), equivalente a escala de turvação 0,5 da escala MacFarland.

### **3.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

A determinação da CIM foi realizada segundo protocolo M27-A2 do CLSI, em microplacas com 96 poços. Em cada orifício foram dispensados 100 µL da amostra teste e 100 µL do inóculo de cada espécie de *Candida* spp., perfazendo volume final de 200 µL em cada poço. Todas as concentrações foram testadas em duplicata. As placas foram incubadas a 28°C e as leituras foram realizadas após 48 horas.

As CIMs foram obtidas por leitura visual e expressas em redução de crescimento, comparadas ao controle positivo, sendo de 80% em Fluconazol e Cetoconazol e 100 % no mentol e nas amostras (GUPTA & KOHLI, 2003).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *C. verticillata verticillata*, o precipitado 1 (P1), a fração diclorometano (FD), clorofórmio (FC), acetato de

etila (FA) e o mentol (M) inibiram o crescimento fúngico conforme descrito na Tabela 3.1.

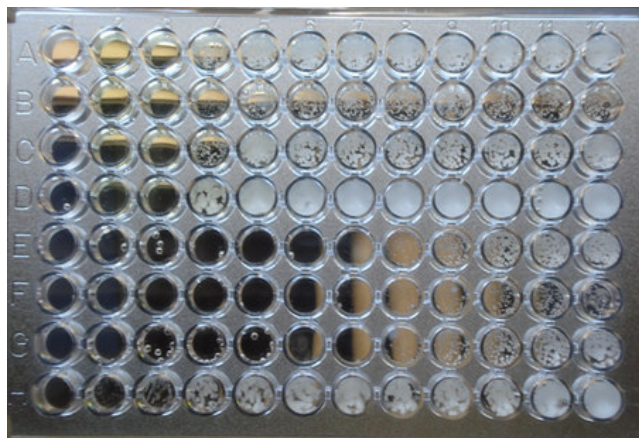
**Tabela 3.1:** Concentração inibitória mínima do extrato hidroalcoólico e frações de *C. verticillata verticillata* pelo método de microdiluição em placa.

Microorganismos	ATCC	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)							
		EHA	P1	FD	FC	FA	M	Flu	Ceto
<i>C. albicans</i>	18804	256	256	256	256	256	256	2	0,25
<i>C. krusei</i>	6258	256	512	125	256	256	125	4	0,25
<i>C. parapsilosis</i>	22019	256	512	256	256	256	256	4	0,25
<i>C. tropicalis</i>	750	256	512	256	125	256	256	>64	4

EHA - Extrato hidroalcoólico, P1 - Precipitado 1, FD - Fração diclorometano, FC - Fração clorofórmio, FA - Fração acetato, M – Mentol, Flu - Fluconazol e Ceto - Cetoconazol.

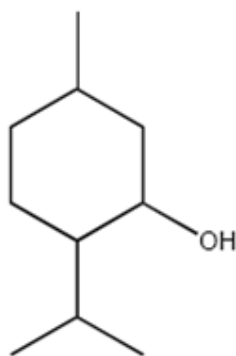
Entre as amostras testadas pelo método de microdiluição em placa (Fig. 3.2), as frações que tiveram os melhores resultados foram a FA com CIM de 125 µg/mL para *C. krusei*, e a FD com CIM de 125 µg/mL para *C. tropicalis*. Os resultados podem ser explicados devido à presença do biciclogermacreno, identificado por comparação do espectro de massa com o padrão na análise em cromatografia gasosa (SILVA *et al.*, 2007).





**Figura 3.2:** Método de microdiluição em placa para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

O perfil de inibição do crescimento da fração diclorometano foi igual ao perfil de inibição do mentol (Fig. 3.3), sendo a CIM de 256  $\mu\text{g/mL}$  para *C. albicans*, 125  $\mu\text{g/mL}$  para *C. krusei*, 256  $\mu\text{g/mL}$  para *C. parapsilosis* e 256  $\mu\text{g/mL}$  para *C. tropicalis*.



**Figura 3.3:** Estrutura química do mentol.

O óleo essencial de menta promoveu inibição do desenvolvimento micelial dos fungos *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* nas concentrações 1500 e 2000 mg/ml, respectivamente (PEREIRA *et al.*, 2006). A atividade antimicrobiana do mentol parece estar associada ao caráter lipofílico (DUARTE, 2006).

A fração acetato de etila das folhas da espécie *Pyrostegia venusta* que contém flavonóides, entre eles a rutina, e compostos fenólicos, inibiu o crescimento de *Candida albicans* na concentração de 300 µg/mL (SILVA *et al.*, 2007).

O extrato das folhas de *Baccharis dracunculifolia* inibiu o crescimento de *Candida krusei* na concentração de 65 µg/mL (SILVA FILHO *et al.*, 2007).

O extrato aquoso de *Serjania erecta* teve atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* com CIM de 62,5 µg/mL. A atividade antifúngica deve-se provavelmente a presença de flavonóides no extrato (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Infecções humanas, particularmente aquelas envolvendo a pele e mucosas constituem um sério problema, especialmente em países desenvolvidos tropicais e subtropicais, sendo os fungos dermatófitos e a levedura *Candida* spp os patógenos mais freqüentes (DUARTE, 2006).

Não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial mesmo aqueles com níveis de inibições superiores. ALIGIANIS *et al.* (2001) propuseram uma classificação

para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 µg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL.

No trabalho de MAGINA *et al* (2007), foram considerados ativos os extratos com MIC menor que 1000 µg/mL, e muito ativos os extratos com MIC inferior a 100 µg/mL.

## **5. CONCLUSÃO**

Os dados obtidos nesse estudo indicam que folhas de *C. verticillata verticillata* apresentam potencial antifúngico promissor nos extratos diclorometano e clorofórmio. São necessários teste com os constituintes químicos isolados dessas frações, buscando atividade superior na inibição do crescimento de *Candida* spp.

## CAPÍTULO 4

### ATIVIDADE DE *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* NO TRATAMENTO DA *Diabetes mellitus*

#### 1. INTRODUÇÃO

##### 1.1. Classificação da *Diabetes mellitus*

Baseando na fisiopatologia da DM, em 1997, a American Diabetes Association propôs uma classificação (Tab. 4.1) que foi posteriormente aceita pela OMS e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; OLIVEIRA, 2004).

**Tabela 4.1:** Classificação etiológica da *Diabetes mellitus*.

I. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
II. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
III. Outros tipos específicos
A) Defeitos genéticos na função da célula $\beta$
B) Defeitos genéticos na ação da insulina
C) Doenças do pâncreas exócrino
D) Endocrinopatias
E) Induzida quimicamente ou por fármacos
F) Infecções
G) Formas incomuns de diabetes imunomediado
H) Outras síndromes genéticas associadas ao <i>Diabetes mellitus</i>
IV. Diabetes gestacional

Fonte: AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; OLIVEIRA, 2004

A DM tipo 1 e tipo 2 são as formas com maior incidência, prevalência e importância clínica (OLIVEIRA, 2004).

A DM tipo 1 é a forma que acomete 5-10% dos pacientes e resulta de destruição auto-imune das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006). As células das ilhotas pancreáticas ou Ilhotas de Langerhans produzem os hormônios peptídeos insulina, glucagon e somatostatina. Cada tipo celular da ilhota produz um hormônio: células  $\alpha$  produzem glucagon, células  $\beta$  produzem insulina e células  $\delta$  produzem somatostatina (LEHNIGER, 2007).

Em 85-90 % dos pacientes com DM tipo 1 estão presentes marcadores da destruição imune das células  $\beta$  pancreáticas. Esses marcadores são auto-anticorpos contra as células  $\beta$ , contra insulina, contra a descarboxilase do ácido glutâmico e contra a tirosina fosfatase IA-2 e IA-2 $\beta$ . Também estão presentes associações com o HLA, genes DQA, DQB e DRB. Entretanto, em alguns casos de diabetes tipo 1, a etiologia é desconhecida (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

Esse tipo da doença é diagnosticado principalmente na infância e juventude e os pacientes têm como características a necessidade diária de insulina, a grande oscilação na glicemia e a tendência a desenvolver cetoacidose diabética. No momento do diagnóstico a maioria dos pacientes já tem cerca de 85% das células  $\beta$  pancreáticas destruídas (OLIVEIRA, 2004).

Já a DM tipo 2 acomete 90-95 % dos pacientes e se caracteriza por resistência à insulina e/ou deficiência relativa na sua secreção (Fig. 4.1). Possui forte predisposição genética; entretanto, esse fator ainda não está bem

definido devido à sua complexidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; GABBAY, CESARINI & DIB, 2003; VELLOZO & PIMAZONI NETTO, 2008; MAUVAIS-JARVIS *et al.*, 2000).



Fonte: VELLOZO & PIMAZONI NETTO, 2008.

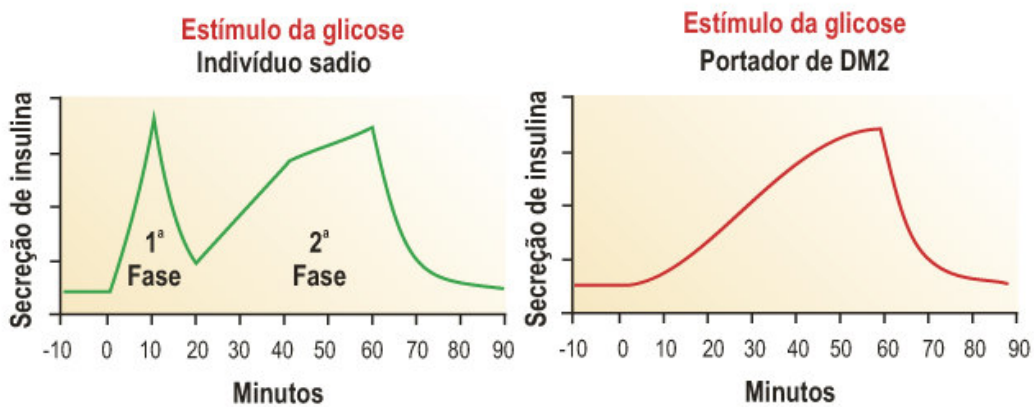
**Figura 4.1:** Defeitos metabólicos básicos da *Diabetes mellitus* tipo 2.

Não está claro se o defeito primário que leva ao DM tipo 2 está na célula  $\beta$  pancreática ou no receptor celular de insulina ou, ainda, na concomitância das duas alterações (CHAVES & ROMALDINI, 2002).

A resistência à ação da insulina é caracterizada pela diminuição da capacidade da insulina em estimular a utilização da glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo. No fígado, essa resistência à insulina leva ao aumento da produção hepática de glicose. Numa fase inicial, a elevação nos níveis de glicemia é compensada pelo aumento da secreção de insulina, mas, à medida

que o processo persiste por períodos prolongados, associa-se um efeito glicotóxico no pâncreas, levando ao aumento da resistência à ação da insulina e diminuição da função da célula beta, devido à hiperglicemia crônica (GABBAY, CESARINI & DIB, 2003).

Uma das manifestações mais precoces da deficiência da célula  $\beta$  é a perda do pico rápido da fase inicial de secreção de insulina após o estímulo alimentar (Fig. 4.2). A ausência desse pico inicial desencadeia a resistência insulínica periférica. A célula  $\beta$  deficiente ativa uma via alternativa liberando pró-insulina que, devido à sua pequena atividade biológica, não consegue regular a hiperglicemia (CHAVES & ROMALDINI, 2002).



Fonte: VELLOZO & PIMAZONI NETTO, 2008.

**Figura 4.2:** Defeitos na secreção de insulina no *Diabetes mellitus* tipo 2.

Existem alguns fatores de risco para a DM tipo 2 que podem ser modificáveis. Pode-se citar a elevação do IMC (Índice de Massa Corporal), que está relacionado à obesidade; sedentarismo; alta ingestão de gorduras e o

aumento da gordura abdominal. Em pacientes com IMC normal e relação cintura/quadril  $> 0,8$  o risco de desenvolver a doença está aumentado (ATUALIZAÇÃO BRASILEIRA SOBRE DIABETES, 2006).

No paciente obeso o aumento dos ácidos graxos livres produz a fosforilação do substrato do receptor de insulina, IRS-1, em serina e não em tirosina. Desta forma não ocorre a ativação da enzima fosfatidilinositol 3 cinase (PI3 cinase) e a conseqüente traslocação do GLUT 4 para a membrana celular, reduzindo a captação de glicose. A resistência insulínica também é influenciada por interleucinas e hormônios produzidos pelos adipócitos, que são a leptina, resistina, adiponectina e o fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (CHAVES & ROMALDINI, 2002).

Sendo assim, a maioria dos pacientes diabéticos tipo 2 são obesos, apresentando também fatores de risco para doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, dislipidemia, microalbuminúria e fatores que promovem a coagulação e trombose (OLIVEIRA, 2004).

O aumento na prevalência da obesidade na adolescência registrado nos últimos anos explicaria, em grande parte, o avanço do DM tipo 2 em populações jovens. As elevadas taxas de obesidade na infância e adolescência estão relacionadas ao sedentarismo e à mudança nos hábitos alimentares, freqüentemente com dietas hipercalóricas e hipergordurosas. A obesidade na infância e na adolescência constitui importante fator de risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica, associada à doença cardiovascular na maturidade (GABBAY, CESARINI & DIB, 2003).



Evidências sugerem que uma dieta rica em cereais integrais e vegetais, em detrimento do consumo de cereais refinados, sacarose e frutose, possa exercer um papel protetor para o DM tipo 2 (SARTORELLI & CARDOSO, 2006).

Nos pacientes diabéticos tipo 2 a cetoacidose diabética é menos freqüente que nos pacientes diabéticos tipo 1 e, quando ocorre, pode estar associada a situações de estresse como infecção ou o uso de medicamento hiperglicemiante, tal como glicocorticóides. A hiperglicemia geralmente é de forma gradual e isso pode levar ao diagnóstico tardio. Com o passar dos anos o controle metabólico se torna mais difícil, podendo levar à necessidade da combinação de drogas orais com mecanismos de ação diferentes e à introdução de insulina no tratamento (OLIVEIRA, 2004).

A base da anormalidade no metabolismo bioquímico de carboidratos, proteínas e lipídeos no DM é a deficiência na secreção e ação da insulina nos tecidos alvos (SKILER, 2004).

Sob condições fisiológicas, a concentração sanguínea de glicose oscila numa faixa estreita. Tal fenômeno, que garante simultaneamente oferta adequada de nutrientes aos tecidos e proteção contra a neuroglicopenia, só é possível graças a um sistema hormonal integrado e eficiente, composto por um hormônio hipoglicemiante, a insulina, e alguns hormônios hiperglicemiantes como o glucagon, o cortisol, a adrenalina e o hormônio de crescimento (VELLOSO & PIMAZONI NETTO, 2008).

A insulina é parte de um eficiente mecanismo que é regulado por um sistema de controle de secreção. A glicose é o principal estimulador da

secreção de insulina; sua entrada na célula  $\beta$  é controlada por um sistema transportador de alta capacidade e baixa afinidade, denominado GLUT 2. Após sua entrada, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato pela ação da enzima glicoquinase (hexoquinase IV), sendo a seguir direcionada à glicólise, etapa que consome 90% da glicose transportada ao interior da célula beta e é responsável pela geração de piruvato. O piruvato é direcionado à mitocôndria, transformado em acetil CoA e metabolizado pelo ciclo de Krebs para produção de ATP. Com o aumento da relação ATP/ADP dentro da célula, 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  $Ca^{2+}$  para a célula  $\beta$ , que ativa um complexo sistema efetor, cujo resultado é a secreção de insulina (VELLOSO & PIMAZONI NETTO, 2008).

A ação da insulina inicia-se com a sua ligação aos receptores tirosina quinase, seguido pela cascata de fosforilações, que promovem a translocação para a membrana celular dos transportadores de glicose do tipo GLUTs (HABER *et al.*, 2001).

## **1.2. Quadro clínico e marcadores da *Diabetes mellitus***

A DM caracteriza-se por hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial (CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002). Os pacientes apresentam os sintomas de poliúria, polidipsia, polifagia e astenia.

A hiperglicemia persistente está vinculada a danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

Nos pacientes diabéticos as conseqüências a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares. Estas complicações crônicas incluem nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ou neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. Pessoas com diabetes apresentam risco maior de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral (CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES, 2002). A DM também está associada ao risco aumentado de disfunção miocárdica, causando múltiplas alterações estruturais no coração, tais como apoptose, diminuição do contato intercelular e deformações nas estruturas contráteis (DYNTAR, 2006).

DM tipo 1 está associada com o aumento do nível de colesterol sérico. A expressão da enzima HMG-CoA redutase, responsável pela regulação da síntese de colesterol, é afetada por colesterol, insulina, hormônio da tireóide e ácidos biliares (LAGOR, GROH & NESS, 2005).

Pacientes diabéticos tipo 2, tipicamente, têm o perfil lipídico aterogênico com aumento de triacilgliceróis, diminuição do HDL colesterol, aumento do LDL colesterol e esteatose hepática (TOLEDO, SNIDERMAN & KELLEY, 2006).

A DM está relacionada a distúrbios no crescimento tecidual que pode ser devido à hiperglicemia crônica e alterações metabólicas. Clinicamente, é

observado hepatomegalia em pacientes diabéticos jovens e adultos. O aumento no crescimento celular está relacionado ao aumento no número de células (hiperplasia), aumento no tamanho celular (hipertrofia) e morte celular (apoptose). São observados hipertrofia renal, hipertrofia vascular e hipertrofia e hiperplasia intestinal. A hiperglicemia também afeta a proteína kinase que controla a mitose celular (HERRMAN *et al.*, 1999).

O elevação nos níveis dos marcadores de injúrias hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) estão associados com o risco de incidência de DM tipo 2 (HANLEY *et al.*, 2004).

A creatinina é um marcador importante da doença renal crônica e nos grupos de risco para doença renal crônica, como nos pacientes diabéticos, é recomendado a triagem de hipercreatininemia (LESSA, 2004).

### **1.3. Fármacos para *Diabetes mellitus***

Existem várias opções de fármacos para o tratamento da DM tipo 2 e eles são classificados de acordo com o mecanismo de ação (Fig. 4.3) (DAVIS & GRANNER, 2003).



Fonte: VELLOZO & PIMAZONI NETTO, 2008.

**Figura 4.3:** Sítios de ação de quatro classes de hipoglicemiantes de uso oral.

Os Inibidores da  $\alpha$ -glicosidase reduzem a absorção intestinal de amido, dextrina e dissacarídeos ao inibirem a ação da  $\alpha$ -glicosidase das vilosidades intestinais. A inibição dessa enzima retarda a absorção dos carboidratos e assim reduz a hiperglicemia pós-prandial (DAVIS & GRANNER, 2003).

Os medicamentos que diminuem a resistência periférica à insulina atuam estimulando a captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo, e reduzindo a liberação de glicose pelo fígado. Pertencem a este grupo as biguanidas (metformina) e glitazonas. A metformina atua principalmente no fígado, reduzindo a liberação hepática de glicose e secundariamente nos músculos e tecido adiposo, diminuindo a resistência a ação da insulina. Já as glitazonas agem preponderantemente nos músculos e tecido adiposo e reduzem a liberação de glicose pelo fígado, embora em menor escala que as biguanidas (VELLOZO & PIMAZONI, 2008). A metformina é a mais utilizada das biguanidas, sendo anti-hiperglicêmica, mas não hipoglicemiante. Administrada

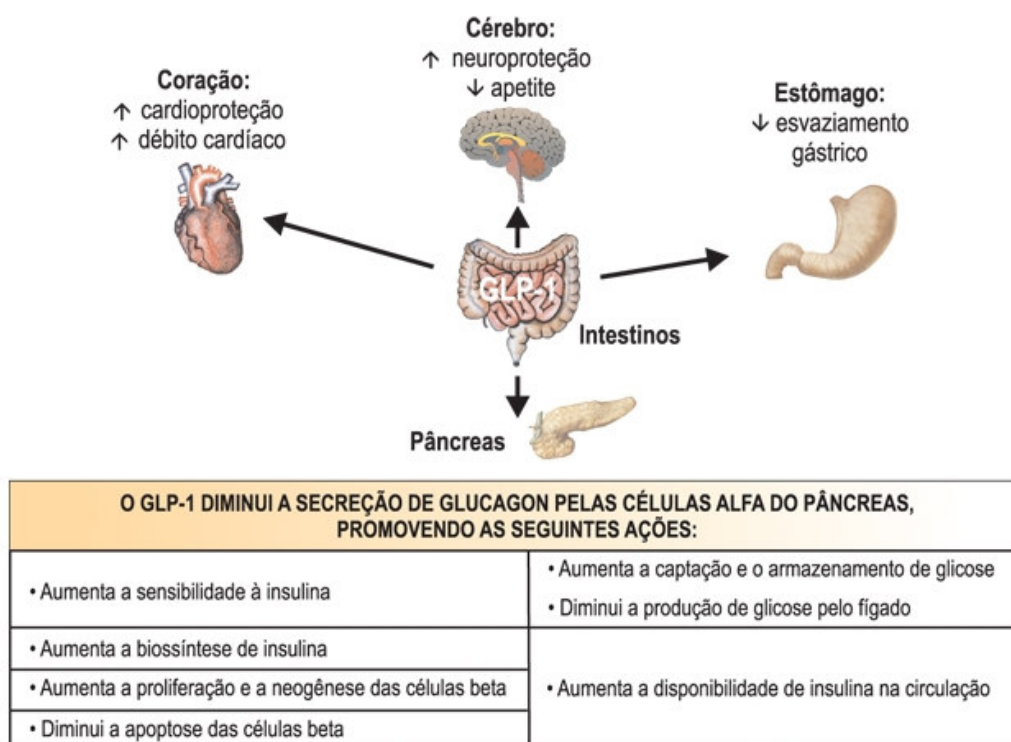
isoladamente ou em combinação com uma sulfoniluréia, melhora o controle glicêmico e as concentrações de lipídios (DAVIS & GRANNER, 2003).

As sulfonilúreias atuam aumentando a liberação de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas e reduzindo a depuração hepática de insulina. As Repaglinidas e as Nateglinidas induzem a secreção de insulina. Sulfoniluréias, Repaglinidas e Nateglinidas bloqueiam os canais de  $K^+$  dependentes de ATP nas células  $\beta$  do pâncreas, levando a uma despolarização da membrana e influxo de  $Ca^{2+}$ , promovendo a secreção de insulina (DAVIS & GRANNER, 2003). Os secretagogos de insulina podem ser de curta duração, como as glinidas para uso prandial, com duração aproximada de 2 horas, e as sulfonilúreias, para cobertura insulínica por períodos de 12 a 24 horas (VELLOZO & PIMAZONI NETTO, 2008).

Existem novas abordagens terapêuticas no tratamento da DM tipo 2. As Tiazolidinodionas são agonistas seletivos de um fator de transcrição denominado receptor nuclear proliferador ativado dos peroxissomo  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), que levam ao aumento da expressão dos transportadores intracitoplasmáticos de glicose (GLUTs) (CHAVES & ROMALDINI, 2002). Esses fármacos ligam-se ao PPAR $\gamma$ , que por sua vez ativa genes responsivos à insulina, que regulam o metabolismo dos carboidratos e lipídios.

Novo conceito no tratamento do DM tipo 2 envolve os fármacos incretinomiméticos e inibidores da enzima DPP-IV. As incretinas são hormônios secretados pelas células endócrinas localizadas no epitélio do intestino delgado. Os dois hormônios principais são o GLP-1 (Glucagon Like Peptide-1) e o GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Peptide) (TAMBASCIA *et al.*, 2008).

Na patogenia do DM tipo 2 o GLP-1 é o mais importante. Os níveis de GLP-1 são baixos no estado de jejum e aumenta após ingestão de refeição rica em carboidratos e lipídeos. Este hormônio exerce importante ação sobre as células  $\beta$  pancreáticas ao estimular a liberação de insulina dependente de glicose e reduzir a secreção de glucagon. Paralelamente, inibe o esvaziamento gástrico e a ingestão de alimentos (Fig. 4.4) (DRUCKER, 2003; CHACRA, 2006).



Fonte: TAMBASCIA *et al*, 2008.

**Figura 4.4:** Ações do GLP-1 nos diversos órgãos.

A enzima DPP-IV inativa o GLP-1 em questão de minutos. A inibição dessa enzima aumenta a vida média do GLP-1 para algumas horas, aumentando assim a ação benéfica no organismo (TAMBASCIA *et al.*, 2008).

Fármacos agonistas do receptor de GLP-1 e inibidores da enzima DPP-IV tem demonstrado resultados promissores em estudos clínicos para o tratamento da DM tipo 2 (DRUCKER, 2003). A exenatida, um agonista do receptor de GLP-1, é o primeiro incretinomimético aprovado para uso clínico em alguns países, inclusive no Brasil (TAMBASCIA *et al.*, 2008).

Se a monoterapia não for suficiente para alcançar o controle glicêmico recomenda-se iniciar a terapia combinada, onde geralmente são utilizados fármacos que exercem mecanismos de ação complementares. Se o tratamento combinado não atingir os níveis glicêmicos desejados, deve-se então iniciar a terapia com insulina (KOSKI, 2006; KIMMEL & INZUCCHI, 2005).

Durante a terapia do paciente diabético, deve-se ficar atento a possíveis ocorrências de interações farmacológicas. No uso de clorpropamida com alopurinol, deve-se ficar atento, pois ambos causam efeitos tóxicos hepáticos e renais. O alopurinol prolonga a meia vida da clorpropamida. Assim, pacientes que recebem os dois fármacos (especialmente os portadores de insuficiência renal) devem ser observados em relação a sinais de hipoglicemia excessiva (FONSECA, 2000).

Pacientes com deficiência de vitamina B<sub>12</sub> tem diminuição da absorção de metformina, por interferência com o fator intrínseco no íleo (OGA & BASILE, 1994).



#### 1.4. Plantas com atividade hipoglicemiante

Muitas espécies de plantas têm sido usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar dos sintomas da DM. A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas, ao serem avaliadas farmacologicamente, demonstraram ter atividade hipoglicemiante (NEGRI, 2005). Dados etnobotânicos relatam que cerca de 800 plantas com potencial antidiabético tiveram resultados positivos em ensaios experimentais (CARVALHO, DINIZ & MUKHERJEE, 2005). Os constituintes químicos destas espécies podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes (NEGRI, 2005).

O mecanismo de ação pelos quais as plantas reduzem a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células  $\beta$  do pâncreas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (NEGRI, 2005).

Algumas plantas associadas ao tratamento da DM são consideradas tóxicas. São relatados muitos efeitos tóxicos causados por plantas, os quais podem resultar em hipoglicemia, tais como, hepatotoxicidade e bloqueio  $\beta$ -adrenérgico (NEGRI, 2005).

Dentre as inúmeras plantas utilizadas no tratamento da DM que já foram avaliadas em estudos *in vivo* destaca-se as espécies do gênero *Bauhinia*, que

tem sido amplamente estudadas quanto à atividade hipoglicemiante. A decoção das folhas da espécie *B. divaricata*, conhecida no México como “pezunã de vaca”, causou efeito hipoglicêmico moderado em coelhos normais. Já a infusão a 20% das folhas secas de *B. candicans* reduziu em 39% a glicemia induzida pelo aloxano, estando este efeito relacionado à presença do alcalóide trigonelina (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002).

A espécie *B. forficata* é a que apresenta maior número de estudos quanto à atividade hipoglicemiante. É considerada, muitas vezes, pela comunidade rural, como “pata-de-vaca” verdadeira e vem sendo muito usada na forma de chás e outras preparações fitoterápicas, uma vez que esta planta já está disponível no mercado farmacêutico. A infusão preparada com as folhas da *B. forficata* não apresentou efeito hipoglicemiante em pacientes com glicemia normal e em pacientes diabéticos tipo 2. Já quando se analisou a ação hipoglicemiante do decocto da planta (150 g/L de água), imitando-se o uso na medicina popular, através da administração oral crônica em ratos diabéticos, os animais mostraram uma melhoria no metabolismo de carboidratos, verificado pelos menores níveis de glicemia e glicosúria. Os resultados destes e de vários outros estudos são contraditórios e podem ser devidos a aspectos, relativos à espécie vegetal, não levados em consideração nas investigações, como os fatores ambientais (tipo de solo, clima) e sazonais, o que pode causar mudanças nos constituintes químicos da espécie (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002).

O extrato aquoso de *Plantago ovata* reduziu a hiperglicemia de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, via inibição da absorção de glicose intestinal (HANNAN *et al.*, 2006).

Os bioflavonóides também exercem efeitos sobre a glicemia. O interesse na aplicação desses flavonóides e seus derivados (glicosídeos) no tratamento e prevenção de diabetes vem aumentando (CAZAROLLI *et al.*, 2006). A rutina reduziu a glicemia e hemoglobina glicosilada em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (KAMALAKKANNAN & PRINCE, 2006).

As isoflavonas atuam no combate a DM (ANJO, 2004). A quercetina, quando administrada a coelhos hiperlipidêmicos, reduziu o colesterol plasmático em 35,07% (LIMA, OLIVEIRA & NAGEM, 2003). A rutina aumentou em 74,28% a atividade *in vitro* da lipase pancreática, indicando possível mecanismo na redução dos níveis de triacilglicerol (LIMA *et al.*, 1999).

Na avaliação dos flavonóides baicaleína, morina, naringenina, naringina, quercetina e rutina em ratos hiperlipidêmicos, a quercetina e rutina, na dose de 5,0 mg, tiveram os melhores resultados na redução dos níveis de colesterol (OLIVEIRA *et al.*, 2002a).

A rutina reduziu estatisticamente o colesterol plasmático de coelhos (OLIVEIRA *et al.*, 2004). A administração de rutina, por 28 dias, a coelhos não evidenciou efeitos hepato e nefrotóxicos (LOPES *et al.*, 2005).

Em coelhos diabéticos, induzidos por aloxano, o propólis, na dose de 150 mg por 28 dias, reduziu a glicemia em 22,69% (OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

### 1.5. Principais aspectos dos coelhos utilizados no experimento

O coelho apresenta estômago e ceco bastante desenvolvidos, bem adaptados à digestão de forragens e cereais, com capacidade de conter cerca de 80% da digesta. Um coelho adulto alimenta-se aproximadamente 20 a 40 vezes ao dia, ingerindo cerca de 1,08 g de alimento por minuto (LEBAS, 1985).

Em comparação com outros herbívoros não ruminantes, o coelho é pouco eficiente na digestão de fibras (CHEEKE, 1995).

Os processos digestivos iniciam-se no momento da ingestão dos alimentos. Os carboidratos são absorvidos em forma de açúcares e as enzimas digestivas são secretadas pelo pâncreas, intestino delgado e mucosa intestinal (CHEEKE, 1995).

Os coelhos podem aproveitar com maior eficiência os alimentos vegetais através da coprofagia, onde eles ingerem parte do material fecal, chamados de fezes moles, ou cecotrofos, que são produzidos a partir da fermentação cecal (FERREIRA, 1987; NOGUEIRA, 1989).

Os modelos mais utilizados para avaliação *in vivo* da atividade antidiabética são animais tratados com aloxano ou estreptozotocina (NEGRI, 2005).

O aloxano é um agente diabetogênico seletivo na destruição das células  $\beta$  do pâncreas. É um composto hidrofílico derivado da pirimidina (ELSNER *et al.*, 2002).

O mecanismo da ação citotóxica ocorre através da produção de espécies reativas de oxigênio e aumento na concentração de cálcio citosólico (SZKUDELSKI, 2001). As espécies reativas de oxigênio são produzidas na

presença de agentes redutores, tais como a glutatona e a cisteína (ELSNER *et al.*, 2002).

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a atividade hipoglicemiante do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Pesquisar um novo fitoterápico à base de *C. verticillata verticillata* para o tratamento da DM.
- Testar as cápsulas contendo o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*.
- Dosar os parâmetros sanguíneos glicose, insulina, triacilglicerol, colesterol total, colesterol HDL, AST, ALT, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico e cortisol para verificar o efeito do fitoterápico à base de *C. verticillata verticillata*.
- Realizar o hemograma completo para acompanhar o efeito do fitoterápico à base de *C. verticillata verticillata*.

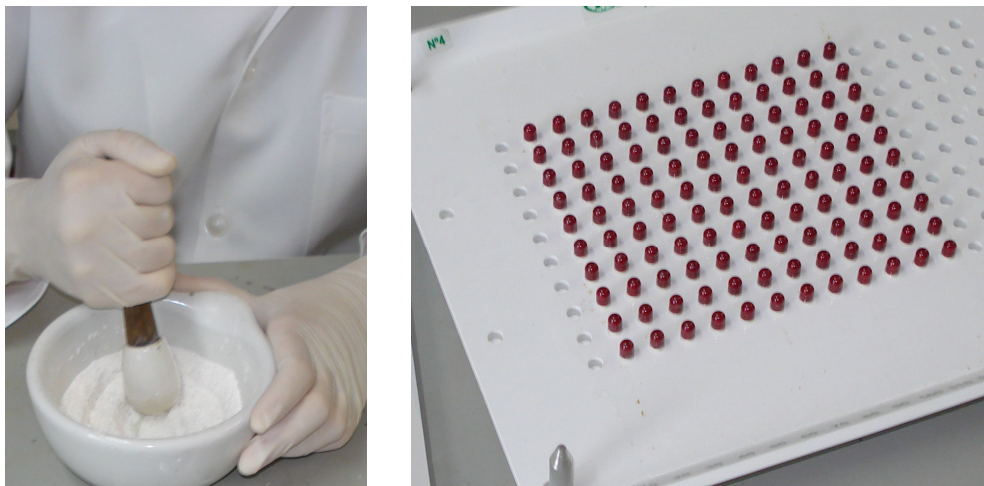
## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Preparação das cápsulas**

Para administração aos coelhos durante o experimento, foram feitas cápsulas com o extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *C. verticillata verticillata* nas doses de 4,5 mg/Kg e 13,5 mg/Kg, que corresponde à dose de

uso popular (Vasconcelos *et al.*, 2007) e três vezes o valor dessa, respectivamente.

Na manipulação (Fig. 4.5) foram utilizadas cápsulas de tamanho nº 4 e como excipiente o talco farmacêutico. A densidade aparente do extrato vegetal foi de 0,628 mg/mL e do talco farmacêutico de 0,551 mg/mL. Esses valores foram utilizados para se calcular a massa de extrato e talco farmacêutico necessários na manipulação das cápsulas contendo 9,0 mg (4,5 mg/Kg) (dose 1) e 27,0 mg (13,5 mg/Kg) (dose 2). O peso médio dos animais foi de aproximadamente 2,0 Kg.



**Figura 4.5:** Manipulação das cápsulas com o extrato de *C. verticillata* supsp. *verticillata*.

No controle de qualidade da manipulação das cápsulas foi realizada a determinação de peso médio de cápsulas duras, de acordo com a metodologia V.1.1, e a determinação do tempo de desintegração, de acordo com a

metodologia V.1.4.1, ambas descritas na Farmacopéia Brasileira IV edição (1988).

### **3.2. Animais**

Os animais utilizados foram fornecidos pelo setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se 24 coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, com idade de 55 dias.

Durante o experimento, os animais foram mantidos na área experimental do Laboratório de Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Eles ficaram em gaiolas individuais (Fig. 4.6), com temperatura na faixa de 22 a 24°C e um fotoperíodo de 12 horas.



**Figura 4.6:** Coelho da raça Nova Zelândia.

### 3.3. Período de adaptação

Durante os primeiros cinco dias os coelhos ficaram em processo de adaptação na área experimental, recebendo 120,0 g de ração comercial peletizada (Soma alimentos) e água *ad libitum*.

### 3.4. Indução da diabetes

No quinto dia os animais foram pesados e submetidos a jejum de 24 horas para indução da diabetes.

A indução foi realizada com injeção intraperitoneal de aloxano (Sigma) 120 mg/Kg (Fig 4.7). O aloxano foi preparado na concentração de 50 mg/mL, em solução salina (NaCl 0,9%) injetável. Foram utilizadas seringas de 5 mL e agulhas de 25X7 mm. O volume administrado foi calculado de acordo com o peso de cada animal.



**Figura 4.7:** Administração intraperitoneal de aloxano 120 mg/Kg nos coelhos.



Em 18 animais, que fizeram parte dos grupos com diabetes, foi administrado a dose de aloxano. Em 6 animais, que pertenceram ao grupo normal, foi administrado apenas solução salina (NaCl 0,9%), também por via intraperitoneal, a fim de se promover o mesmo estresse dos outros animais.

Todos os animais receberam, 4, 8 e 12 horas após a indução, 10 mL de solução saturada de glicose, por via oral, a fim de se evitar a morte por hipoglicemia.

### **3.5. Organização dos grupos experimentais**

Oito dias após a indução da diabetes com aloxano, foram retiradas amostras de sangue dos animais pela veia marginal da orelha, em tubo contendo os anticoagulantes fluoreto de potássio e sal de EDTA, para a determinação da glicemia.

Os animais que apresentaram glicemia superior a 180 mg/dL foram separados aleatoriamente nos grupos experimentais 2 a 6. Os animais que não foram submetidos à indução com o aloxano ficaram no grupo 1. A organização dos grupos experimentais está demonstrada na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Grupos de coelhos utilizados nos testes de avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. verticillata verticillata*.

<b>Grupo de coelhos (n=6)</b>	<b>Características dos animais</b>
G1	Com diabetes, não tratado
G2	Grupo normal
G3	Com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg
G4	Com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg

### **3.6. Período de tratamento**

O tratamento foi realizado num período de 28 dias. De acordo com o grupo experimental, os animais receberam as cápsulas, todos os dias no mesmo horário. Após 30 minutos da administração do medicamento foi fornecido 120 g de ração a cada animal. O fornecimento de água durante todo o período foi *ad libitum*.

### **3.7. Dosagens de parâmetros sanguíneos**

Os parâmetros sanguíneos glicose, triacilglicerol, colesterol total, colesterol HDL, AST, ALT, proteínas totais, albumina, fosfatase alcalina, uréia, creatinina e ácido úrico foram dosados utilizando os kits da Bioclin - Quibasa e o Equipamento Multiparamétrico de Bioquímica - Alizé. A insulina e o cortisol foram dosados com os kits Beckman Coulter no equipamento Access. O hemograma completo foi realizado no contador eletrônico Coulter, marca Humacount (902.405).

A coleta de sangue foi feita no tempo 0, 14 e 28 dias de tratamento. O sangue foi coletado na veia marginal da orelha. Para a dosagem de glicose no plasma foi utilizado tubo contendo fluoreto, que inibe as enzimas da via glicolítica, e assim inibe o consumo da glicose após a coleta, evitando valores de glicemia inferiores ao normal. As demais dosagens bioquímicas foram realizadas em plasma heparinizado, sendo a coleta feita em tubo com heparina. O sangue utilizado na realização do hemograma foi coletado em tubo contendo sal de EDTA 10%, a fim de se evitar a coagulação sanguínea e a conseqüente interferência nos parâmetros como, por exemplo, diminuição do número de plaquetas na hora da realização do exame.

### **3.8. Eutanásia**

No fim do período de tratamento os animais foram eutanasiados utilizando-se Xilazina (5 mg/Kg) e Cetamina (20 mg/Kg) por via intramuscular e posterior punção cardíaca para coleta de sangue utilizado nas dosagens dos parâmetros sanguíneos.

### **3.9. Estatística**

Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey e Dunnet.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No controle de qualidade do processo de manipulação das cápsulas contendo o extrato seco, nenhuma das cápsulas excedeu o valor do peso

médio  $\pm 10\%$ , ou seja, 14,93 mg  $\pm 10\%$  para a dose de 4,5 mg/Kg e 17,06 mg  $\pm 10\%$  para a dose de 13,5 mg/Kg, estando assim de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV edição (1988). Esse resultado confirma a homogeneidade da dose nas cápsulas utilizadas, garantindo a dose individual correta.

O tempo de desintegração das cápsulas foi de 4,0 min para a dose de 9,0 mg e 5,0 min para a dose de 27,0 mg. De acordo com a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), o tempo de desintegração para cápsulas duras deve ser inferior a 45,0 min, assim os valores encontrados estão de acordo com o preconizado e isso demonstra que está ocorrendo a desintegração da cápsula e a liberação do principio ativo no momento do teste *in vivo*.

A avaliação da atividade hipoglicemiante de *C. verticillata verticillata* foi realizada através das dosagens dos parâmetros bioquímicos e hematológicos dos coelhos com diabetes induzida por aloxano.

**Tabela 4.3:** Valores médios de glicose ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Glicose (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G1	345 $\pm$ 25 A	0	387 $\pm$ 4 A	0	455 $\pm$ 13 A	0
G2	136 $\pm$ 6 B	-61*	101 $\pm$ 4 C	-74*	105 $\pm$ 6 C	-77*
G3	332 $\pm$ 45 A	-4	312 $\pm$ 60 AB	-19	297 $\pm$ 45 B	-35*
G4	360 $\pm$ 60 A	+4	227 $\pm$ 22 BC	-41*	184 $\pm$ 16 C	-60*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4.3, pôde-se verificar que os animais do grupo 3 tiveram redução de 35% na glicemia aos 28 dias de

tratamento. Já os animais do grupo 4 tiveram redução de 60% na glicemia, com os níveis de glicose plasmáticos reduzindo de 360,0 para 184,0 aos 28 dias.

Observou-se também que, durante todo o período experimental, o tratamento com a dose de 13,5 mg/Kg propiciou uma melhor resposta na redução dos níveis de glicose, sendo que aos 28 dias de tratamento a glicemia do grupo 4 não diferia estatisticamente do grupo normal (G2).

A glicemia do grupo com diabetes, não tratado (G1) estava 74% maior aos 14 dias e 77% aos 28 dias quando comparado ao grupo normal (G2).

A dose de 4,5 mg/Kg, que é a dose de uso popular (VASCONCELOS *et al.*, 2007), promoveu redução na glicemia. Entretanto, a dose de 13,5 mg/Kg, que é 3 vezes maior, foi mais eficiente tanto no tempo de tratamento necessário para que começasse a ocorrer a redução na glicemia como na porcentagem de diminuição da glicemia dos coelhos.

A atividade hipoglicemiante de *C. verticillata verticillata* encontrada nesse estudo pode ser explicada pela presença de flavonóides no extrato, dentre eles a rutina, que foi identificada por CLAE. A administração oral de rutina a ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina, reduziu significativamente os níveis plasmáticos de glicose e hemoglobina glicosilada (KAMALAKKANNAN & PRINCE, 2006).

Os extratos brutos das folhas de *Brickellia veronicaefolia* produziram efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por aloxano e a partir do extrato foi isolada a 5,7,3'-triidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona, a qual produziu um efeito hipoglicêmico significativo, porém menos efetivo do que a tolbutamida (PEREZ *et al.*, 2000). Os flavonóides encontrados no extrato aquoso de *Ajuga*

*iva* apresentaram atividade hipoglicemiante (HILALY & LYOUSSI, 2002), assim como os flavonóides rutina e isoquercetina encontrados no extrato aquoso de *Phyllanthus sellowianus* (HNATYSZYN *et al.*, 2002).

Os esteróides e os flavonóides encontrados no extrato metanólico das sementes de *Punica granatum* também apresentaram atividade hipoglicemiante (DAS *et al.*, 2001). Três derivados de canferol glicosilados isolados do extrato aquoso e butanólico das partes aéreas de *Equisentum myriochaetum* exerceram atividade hipoglicemiante em ratos que tiveram diabetes induzida por estreptozotocina (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001).

As antocianinas compreendem um grupo de pigmentos de plantas do tipo flavonóide. Essas substâncias são encontradas nos vacúolos das plantas e suas cores dependem do pH, de substituições no anel B e de suas copigmentações com outros flavonóides e ácidos fenólicos. A presença dessa substância em *C. verticillata* foi descrita por GARCIA *et al.* (1999). Na avaliação da atividade hipoglicemiante em coelhos diabéticos induzidos por aloxano, a antocianina promoveu a queda dos níveis de glicose, com reduções de 10,78% aos 7 dias, 10,54% aos 14 dias, 17,33% aos 21 dias e 28,09% aos 28 dias (OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

A presença de compostos fenólicos no extrato de *C. verticillata* confirmada, nesse estudo, pela reação com o reagente de Folin-Ciocalteu, também pode ter atuado na atividade redutora dos níveis de glicose sanguínea dos grupos. Substâncias fenólicas como o ácido isoferúlico extraído do rizoma da *Cimicifuga dahurica* apresentou atividade hipoglicemiante *in vivo* (LIU *et al.*, 1999). Polifenóis como a galocatequina, epicatequina,

epigalocatequina e o galato de epigalocatequina possuem atividade antidiabética (NEGRI, 2005).

A presença de alcalóides na espécie *C. verticillata* pode explicar o efeito hipoglicemiante. O alcalóide multiflorina, isolado de plantas leguminosas, exerce efeito hipoglicemiante. Derivados da criptolepina, um membro da família dos alcalóides indoloquinolinas, possuem atividade hipoglicemiante (NEGRI, 2005).

**Tabela 4.4:** Valores médios de insulina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Insulina (uIU/mL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	0,50 $\pm$ 0,12 A	0	0,50 $\pm$ 0,15 A	0	0,50 $\pm$ 0,12 A	0
G 2	2,11 $\pm$ 0,49 B	+321*	1,63 $\pm$ 0,69 A	+226	1,45 $\pm$ 0,30 B	+190*
G 3	0,50 $\pm$ 0,12 A	0	0,47 $\pm$ 0,09 A	-7	0,45 $\pm$ 0,10 A	-11
G 4	0,50 $\pm$ 0,15 A	0	0,39 $\pm$ 0,08 A	-22	0,33 $\pm$ 0,08 A	-35

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

Como apresentado na Tabela 4.4, o grupo normal (G2) foi o que teve os maiores valores de insulina, estando 321, 226 e 190% maior do que o grupo com diabetes, não tratado nos tempos 0, 14 e 28 dias respectivamente. Esse resultado demonstra que as células  $\beta$  foram destruídas nos grupos G1, G2 e G3, que foram os grupos que receberam aloxano por via intraperitoneal. A pequena quantidade de insulina que foi dosada no plasma é, possivelmente devido à produção do trato gastrointestinal, que também contém células produtoras de insulina (MOTTA, 2003).

Os valores plasmáticos de insulina dos coelhos não tiveram alterações estatisticamente significativas nos grupos tratados com as doses de 4,5 mg/Kg (G3) e 13,5 mg/Kg (G4) quando comparados ao grupo com diabetes, não tratado (G1).

Nenhuma das doses testadas do extrato promoveu aumento na concentração plasmática de insulina dos coelhos, indicando que não é a estimulação da liberação de insulina o mecanismo de ação pelo qual o extrato de *C. verticillata verticillata* diminui as taxas de glicose (NEGRI, 2005).

O extrato pode ter reduzido a glicemia através do aumento no número e na sensibilidade do sítio receptor de insulina, da diminuição da degradação de glicogênio, ou aumento da produção do glicogênio. Entretanto, não se pode deduzir qual mecanismo ou mecanismos promoveu a redução da glicemia (NEGRI, 2005; PEPATO *et al.*, 2003).

Flavonóides, entre eles a rutina, podem estimular os efeitos da insulina nas células através do mecanismo de segundo mensageiro (por exemplo influenciando a proteína fosfofrutoquinase), e se ligar aos receptores de insulina, promovendo assim redução da glicemia (HAVSTEEN, 2002).

A insulina é um hormônio anabólico que estimula a captação de glicose pelos tecidos adiposo e muscular, promove a conversão de glicose a glicogênio (glicogenose) ou em gordura para o armazenamento, inibe a produção (gliconeogênese) e liberação (glicogenólise) de glicose pelo fígado. Também estimula a síntese de proteínas, lipídios e colesterol e inibe o desdobramento protéico (proteólise), cetogênese, lipólise e a oxidação dos ácidos graxos (MOTTA, 2003).



Os flavonóides kaempherol-3- $\alpha$ -raminosídeo e quercetina-3- $\alpha$ -raminosídeo foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliar o efeito na síntese do glicogênio. Diferentemente da insulina, que foi utilizada como controle positivo, os flavonóides testados não estimularam a síntese do glicogênio (BELTRAME *et al.*, 2001).

**Tabela 4.5:** Valores médios de cortisol ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Cortisol (pmol/L)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	>1624962	0	>1624962	0	>1624962	0
G 2	>1624962	0	>1624962	0	>1624962	0
G 3	>1624962	0	>1624962	0	>1624962	0
G 4	>1624962	0	>1624962	0	>1624962	0

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com a Tabela 4.5, com o método utilizado na dosagem, os valores plasmáticos de cortisol, dos coelhos tratados com o extrato de *C. verticillata verticillata*, não foram diferentes entre os grupos e não sofreram alterações durante o experimento. Mesmo com diluição excessiva do plasma, não se chegou a um valor mensurável pela curva padrão.

O cortisol, quando está elevado na circulação sanguínea, leva ao aumento nas concentrações plasmáticas de glicose, o que pode interferir nos resultados de glicemia.

Em situações de hipoglicemia, o cortisol e o glucagon estimulam o aumento de glicose. Em situações de estresse o nível de cortisol é elevado,

levando a aumento de glicose. Neste estudo o nível de cortisol foi acima de 1.624.962 pmol/L.

**Tabela 4.6:** Valores médios de colesterol total ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Colesterol total (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	77,85 $\pm$ 2,24 A	0	64,35 $\pm$ 2,65 A	0	62,50 $\pm$ 1,11 A	0
G 2	71,68 $\pm$ 3,82 A	-28	59,50 $\pm$ 3,29 A	-8	55,38 $\pm$ 3,64 A	-12
G 3	60,73 $\pm$ 7,87 A	-22	58,48 $\pm$ 4,75 A	-9	66,98 $\pm$ 6,44 A	+7
G 4	95,9 $\pm$ 10,73 A	+19	53,93 $\pm$ 3,26 A	-16	93,06 $\pm$ 4,83 B	+48*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados obtidos os teores de colesterol total foram maiores para o grupo 4 (+48%) (Tab. 4.6), entretanto apesar de não ter ocorrido redução nos níveis de colesterol, eles não estavam elevados.

O extrato aquoso de *C. verticillata* administrado a ratos diabéticos, por quatro semanas, elevou os níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos (BELTRAME *et al.*, 2002).

Os flavonóides apresentaram efeito na redução nos níveis sanguíneos de colesterol total e triacilgliceróis. Este efeito pode ser explicado, em parte, pelo aumento da atividade da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), enzima presente na superfície das lipoproteínas de alta densidade (HDL), que converte o colesterol presente em quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), LDL e tecidos periféricos em ésteres de colesterol, transportando-os para o fígado para serem metabolizados, reduzindo assim os níveis de colesterol sanguíneo (SILVA *et al.*, 2001).

**Tabela 4.7:** Valores médios de HDL colesterol ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	HDL colesterol (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	36,45 $\pm$ 1,13 A	0	36,23 $\pm$ 0,62 A	0	23,83 $\pm$ 0,75 AB	0
G 2	36,03 $\pm$ 1,54 A	-1	29,63 $\pm$ 1,52 B	-18*	28,30 $\pm$ 2,16 A	+18
G 3	24,45 $\pm$ 0,63 B	-33*	25,75 $\pm$ 0,98 B	-28*	18,75 $\pm$ 1,32 B	-21*
G 4	34,08 $\pm$ 2,97 A	-7	27,93 $\pm$ 1,66 B	-23*	28,89 $\pm$ 1,93 A	+21

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados descritos na Tabela 4.7, a dose de 13,5 mg/Kg aos 28 dias foi capaz de aumentar o HDL colesterol em 21%, o que é uma vantagem, pois o colesterol-HDL transporta o colesterol da circulação para o fígado, onde ele é metabolizado (LIMA, OLIVEIRA & NAGEM, 2003).

Os flavonóides e alguns corantes naturais têm apresentado propriedades farmacológicas que são benéficas na prevenção dos processos de aterosclerose e outras desordens do metabolismo lipídico (LIMA *et al.*, 1999).

**Tabela 4.8:** Valores médios de triglicerídeos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata* subsp. *verticillata*.

Grupo	Triglicerídeos (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	228,12 $\pm$ 4,94 A	0	564,00 $\pm$ 10,11A	0	621,66 $\pm$ 26 A	0
G 2	143,32 $\pm$ 7,25 B	-37*	76,65 $\pm$ 6,74 B	-87*	77,78 $\pm$ 5,57 C	-87*
G 3	90,90 $\pm$ 1,76 C	-60*	171,98 $\pm$ 32,82C	-70*	203,95 $\pm$ 39 B	-67*
G 4	79,92 $\pm$ 5,47 C	-65*	51,48 $\pm$ 3,01 C	-91*	177,32 $\pm$ 20 BC	-72*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 4.8, observou-se que o nível de triglicerídeos no grupo 3, reduziu em 70% aos 14 dias e 67% aos 28

dias. O tratamento do grupo 4 reduziu 91% aos 14 dias e 72% aos 28 dias. Observou-se que um aumento na dose foi mais eficaz na redução deste parâmetro sanguíneo. Este resultado é favorável a pacientes diabéticos e a pacientes hipertrigliceridêmicos.

Os triglicerídeos são hidrolisados pela enzima lípase e, considerando que a rutina aumenta a atividade da lípase em 74,28%, pode-se deduzir que a redução nos níveis sanguíneos de triglicerídeos seja devido à presença da rutina no extrato e que o mesmo pode atuar reduzindo a hipertrigliceridemia em animais testados. Na diabetes sabe-se que, ao diminuir a produção de insulina, ocorre redução na atividade da lípase, que é a enzima que hidrolisa o triacilglicerol (LIMA, OLIVEIRA & NAGEM, 2003).

VIANA *et al.* (2004) também relataram diminuição significativa nos níveis de triglicerídeos de ratos diabéticos, induzidos por aloxano, tratados com o extrato aquoso de *C. verticillata*.

O composto fenólico bacuquiol isolado do extrato de *Otholobium pubescens* reduziu significativamente a taxa de glicose e triglicerídeos no sangue (KRENISKY *et al.*, 1999).

**Tabela 4.9:** Valores médios de Albumina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Albumina (g/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	3,53 $\pm$ 0,12 A	0	3,60 $\pm$ 0,05 A	0	3,73 $\pm$ 0,04 A	0
G 2	3,21 $\pm$ 0,04 AB	-9*	3,13 $\pm$ 0,06 B	-13*	3,60 $\pm$ 0,13 A	-4
G 3	2,90 $\pm$ 0,07 BC	-18*	3,35 $\pm$ 0,07 AB	-7	3,52 $\pm$ 0,03 A	-6
G 4	2,82 $\pm$ 0,08 C	-21*	3,21 $\pm$ 0,12 B	-11*	3,58 $\pm$ 0,11 A	-4

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 4.9, os tratamentos reduziram a porcentagem de albumina.

A albumina é uma proteína cuja síntese ocorre no fígado e suas funções biológicas são ligação e transporte de numerosas substâncias tais como íons metálicos, aminoácidos, hormônios, ácidos graxos, bilirrubina, enzimas, metabólitos ou produtos tóxicos. Ela desempenha importante papel na manutenção da pressão osmótica devido ao seu peso molecular relativamente baixo (LIBERATO, 2001).

O fígado produz 12 g de albumina/dia, representando 25% do total de proteínas sintetizadas pelo fígado e metade das proteínas secretadas (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A patogênese de doenças vasculares na DM envolve alterações no mecanismo homeostático como alterações na função plaquetária, na função celular endotelial e no balanço homeostático, particularmente das proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação. O fígado de ratos diabéticos tem capacidade reduzida para sintetizar e secretar certas proteínas plasmáticas, particularmente albumina. Para manter um balanço homeostático na circulação, a taxa de catabolismo dessas proteínas deve ser proporcionalmente reduzida em mamíferos diabéticos (HATTON *et al.*, 1995).

A hipoalbuminemia ocorre na síndrome nefrótica, devido a perdas maciças através dos rins; na diminuição da capacidade de síntese, nos casos de insuficiência hepática avançada (cirrose, colangite, fígado cardíaco, hepatites crônicas, neoplasias); no catabolismo exaltado que acompanha a

DM, a tireotoxicose, os estados febris prolongados e nas hemorragias maciças (LIMA *et al.*, 1985).

**Tabela 4.10:** Valores médios de proteínas totais ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Proteínas totais (g/L)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	51,18 $\pm$ 1,42 A	0	59,91 $\pm$ 1,22 A	0	69,66 $\pm$ 2,34 A	0
G 2	48,82 $\pm$ 2,25 AB	-5	47,05 $\pm$ 2,20 B	-21*	59,25 $\pm$ 3,29 B	-15*
G 3	41,55 $\pm$ 1,90 BC	-19*	51,13 $\pm$ 2,16 AB	-15*	57,25 $\pm$ 1,86 B	-18*
G 4	40,00 $\pm$ 1,84 C	-22*	50,18 $\pm$ 3,53 AB	-16*	57,78 $\pm$ 2,10 B	-17*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.10, os tratamentos reduziram a concentração de proteínas totais no plasma. O G3 reduziu 15% aos 14 dias e 18% aos 28 dias de tratamento. O G4 aos 14 dias reduziu 16% e aos 28 dias reduziu 17%.

Estudos indicam a não-toxicidade de flavonóides em relação aos níveis de proteínas plasmáticas. Ao avaliar os efeitos toxicológicos de alguns flavonóides (dentre eles a quercetina) no nível de proteína total de coelhos saudáveis, verificou que tais substâncias não provocaram alterações consideráveis no metabolismo protéico desses animais (RIBEIRO *et al.*, 2006).

A quercetina e a rutina após absorção são transportadas no plasma ligadas às proteínas. No fígado são conjugadas com o glicuronídeo e sulfato e seu tempo de meia vida é de 12 a 19 horas (SCHWEDHELM *et al.*, 2003).

A hiperproteinemia pode significar desidratação, enfermidades monoclonais e enfermidades policlonais crônicas, dentre elas a cirrose hepática. Também indica aumento do volume plasmático, perda renal de

proteínas, perda de proteínas pela pele, gota e distúrbios da síntese protéica dentre elas enfermidade hepática não – virótica severa e a insuficiência da função hepatocelular na enfermidade hepática crônica (RIBEIRO *et al.*, 2006).

**Tabela 4.11:** Valores médios de creatinina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Creatinina (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	1,09 $\pm$ 0,036 A	0	1,88 $\pm$ 0,05 A	0	1,98 $\pm$ 0,05 A	0
G 2	1,08 $\pm$ 0,030 A	+1	1,06 $\pm$ 0,07 B	-44*	1,20 $\pm$ 0,06 B	-40*
G 3	1,00 $\pm$ 0,061 A	-8	1,25 $\pm$ 0,07 B	-34*	1,35 $\pm$ 0,08 B	-31*
G 4	0,98 $\pm$ 0,033 A	-10	1,20 $\pm$ 0,04 B	-36*	1,40 $\pm$ 0,06 B	-30*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4.11, os níveis plasmáticos de creatinina de G3 foi reduzido em 34% aos 14 dias e em 31% aos 28 dias. No G4, aos 14 dias observou-se diminuição de 36% e aos 28 dias de 30%.

A rutina nas doses de 20, 40 e 60 mg, administradas a coelhos por período de 28 dias, não promoveu alterações significativas nos níveis de creatinina plasmática. Esses resultados indicam que a rutina não provocou efeitos nefrotóxicos nos animais testados (LOPES *et al.*, 2005).

A creatinina é o elemento nitrogenado do sangue com concentração menos variável. É um anidro de creatina, que é um derivado da guanina. No organismo, em condições normais, creatina se transforma em creatinina. Durante a contração muscular, a fosfocreatina libera creatina, ácido fosfórico e mais 1100 calorias. Durante o repouso, a creatina reverte em fosfocreatina, obtendo energia da decomposição do glicídio no músculo. A creatinina é

eliminada do plasma por filtração glomerular e não é reabsorvida nos túbulos em grau significativo (LIBERATO, 2001).

A determinação da depuração da creatinina endógena é um teste conveniente e fornece uma estimativa razoável da taxa de filtração glomerular. Valores aumentados para a depuração carecem de significação clínica. Erros na coleta da urina produzem resultados de pouca validade (MOTTA, 2003).

A diminuição da depuração da creatinina é um indicador muito sensível da redução de taxa de filtração glomerular. Isto ocorre em enfermidades agudas ou crônicas do glomérulo ou em algum dos seus componentes. A redução do fluxo sanguíneo do glomérulo diminui a depuração da creatinina. Fenômeno semelhante pode ocorrer na lesão tubular aguda (MOTTA, 2003).

**Tabela 4.12:** Valores médios de uréia ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Uréia (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	16,43 $\pm$ 1,08 A	0	47,55 $\pm$ 0,73 A	0	41,53 $\pm$ 0,40 A	0
G 2	17,72 $\pm$ 1,29 A	+7	24,55 $\pm$ 0,87 B	-48*	24,92 $\pm$ 1,86 B	-40*
G 3	29,89 $\pm$ 1,79 B	+75*	43,44 $\pm$ 1,04 A	-8	40,20 $\pm$ 3,69 A	-4
G 4	35,56 $\pm$ 2,86 B	+116*	43,43 $\pm$ 5,10 A	-8	39,43 $\pm$ 3,47 A	-5

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.12 os níveis plasmáticos de uréia de G3 foram reduzidos em 8% aos 14 dias e em 4% aos 28 dias. No G4, observou-se redução de 8% aos 14 dias e de 5 % aos 28 dias.

Em pacientes com complicações diabéticas e em glomerulonefrites a uréia pode ser elevada. Este parâmetro nos mamíferos é o principal produto final do metabolismo protéico. O aumento do teor de uréia no sangue pode ser



devido à redução da eliminação renal, aumento do catabolismo protéico e combinação destes dois mecanismos. A taxa de uréia se acha reuzida na insuficiência hepática aguda e necrose hepática (LIMA *et al.*, 1985).

A administração do decocto de *C. verticillata* a ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina diminuiu a quantidade de uréia excretada na urina, diminuindo a poliúria e causando menor desidratação e conseqüentemente menor consumo de água pelos animais. A diminuição na excreção de uréia na urina demonstra que ocorreu melhora no metabolismo de proteínas após o tratamento com o decocto (PEPATO *et al.*, 2003).

**Tabela 4.13:** Valores médios de ácido úrico ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Ácido úrico (mg/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	1,12 $\pm$ 0,003 A	0	0,17 $\pm$ 0,02 A	0	0,45 $\pm$ 0,01 A	0
G 2	0,66 $\pm$ 0,127 B	-41*	0,45 $\pm$ 0,10 B	+164*	0,32 $\pm$ 0,03 B	-29*
G 3	0,43 $\pm$ 0,036 B	-23*	0,16 $\pm$ 0,03 A	-6	0,14 $\pm$ 0,02 C	-79*
G 4	0,40 $\pm$ ,0554 B	-27*	0,15 $\pm$ 0,02 A	-12	0,23 $\pm$ 0,04 BC	-49*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4.13, observou-se que aos 28 dias houve uma redução de 79% para o G3 e de 49% no G4.

A rotina nas doses de 20, 40, 60 mg administradas a coelhos por 28 dias, não causaram alterações renais consideradas prejudiciais, pois ocorreram pequenas variações nas concentrações de uréia e ácido úrico (LOPES *et al.*, 2006).

O aumento da uricemia pode ocorrer por redução da excreção renal ou pelo excesso de produção. Os valores aumentados são observados em todas

as formas de insuficiência renal. Na gota, que é um distúrbio do metabolismo primário os índices se situam acima de 10 mg/dL. Ocorre aí excessiva produção de ácido úrico e redução da excreção renal (LIMA *et al.*, 1985).

**Tabela 4.14:** Valores médios de Aspartato aminotransferase (AST) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	61,83 $\pm$ 1,72 A	0	289,17 $\pm$ 13,9 A	0	289,84 $\pm$ 14 A	0
G 2	54,00 $\pm$ 2,69 AB	-13*	55,26 $\pm$ 4,37 B	-81*	138,53 $\pm$ 10 B	-52*
G 3	24,83 $\pm$ 0,91 C	-60*	283,83 $\pm$ 29,9 A	-3	414,26 $\pm$ 14 C	+67*
G 4	47,33 $\pm$ 2,45 B	-23*	283,17 $\pm$ 20,9 A	-2	357,00 $\pm$ 42 C	+24*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados de AST listados na tabela 4.14, aos 28 dias o G3 teve um aumento de 67% e o G4 de 24%.

Os teores mais elevados de AST e ALT ocorrem na necrose hepática, no envenenamento por tetracloreto de carbono, hepatite virótica e no infarto do miocárdio. Na DM aumenta mais os níveis AST, que também aumenta na anemia hemolítica aguda, necrose renal, queimaduras graves e no cateterismo cardíaco (LIMA *et al.*, 1985).

**Tabela 4.15:** Valores médios de Alanina aminotransferase (ALT) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Tempo 0		ALT (UI) Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	69,66 $\pm$ 0,33 A	0	120,50 $\pm$ 1,4 A	0	140,73 $\pm$ 2,10 A	0
G 2	41,00 $\pm$ 3,88 B	-42*	41,05 $\pm$ 4,40 C	-66*	121,00 $\pm$ 6,14 A	-14
G 3	15,00 $\pm$ 0,94 C	-79*	112,50 $\pm$ 3,9 AB	-6	140,40 $\pm$ 12,06 A	0
G 4	15,66 $\pm$ 0,92 C	-78*	104,83 $\pm$ 1,6 B	-13*	134,00 $\pm$ 23 A	-5

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados compilados na Tabela 4.15, o parâmetro sanguíneo ALT no G3 teve uma redução de 6% aos 14 dias e nenhuma variação aos 28 dias. O G4 teve uma redução de 13% aos 14 dias e de 5% aos 28 dias. No entanto quando se observou os valores em relação ao grupo normal (G2) os valores desta enzima foram muito superiores aos 14 dias e 28 dias.

Segundo VIANA *et al.* (2004) níveis elevados de transaminases séricas ocorrem em animais diabéticos induzidos por aloxano ou streptozotocina.

Alteração nas transaminases foi observado com a administração do extrato aquoso de *C. verticillata* a ratos diabéticos induzidos por aloxano que promoveu aumento significativo nos níveis de AST e ALT, ocorrendo aumento também no grupo controle diabético não tratado (VIANA *et al.*, 2004). Valores aumentados de AST e ALT estão correlacionados com danos hepáticos ou problemas cardíacos (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

As transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e alfa-ceto-ácidos por transferência do grupo amino. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, predominando AST no fígado, coração,

músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas, e ALT no fígado, rim e coração. A AST está presente no citosol e na mitocôndria dos hepatócitos. A atividade plasmática desta enzima é controlada por um mecanismo de liberação enzimática localizada na membrana do hepatócito. A velocidade de excreção das transaminases é variável, sendo a AST eliminada mais rapidamente do que a ALT (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Alterações nas transaminases Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) e na Fosfatase alcalina caracterizam alterações hepáticas. Elevação na atividade dessas enzimas ocorre com maior frequência em pacientes diabéticos quando comparados a indivíduos normais e estão associadas a complicações como neuropatia e retinopatia, independente do consumo de álcool, índice de massa corporal e controle metabólico (VIANA *et al.*, 2004).

**Tabela 4.16:** Valores médios de Fosfatase alcalina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Fosfatase alcalina (U/L)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	118,33 $\pm$ 0,42 A	0	151,00 $\pm$ 3,14 A	0	31,00 $\pm$ 2,19 A	0
G 2	125,50 $\pm$ 14,16 A	+6*	129,3 $\pm$ 14,65 AB	-14	7,36 $\pm$ 0,25 C	-77*
G 3	65,84 $\pm$ 2,37 B	-45*	138,5 $\pm$ 5,07 AB	-8	11,59 $\pm$ 0,40 BC	-63*
G 4	49,83 $\pm$ 3,08 B	-58*	103,50 $\pm$ 10,31 B	-31*	14,00 $\pm$ 2,25 B	-55*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados inseridos na Tabela 4.16, o G4 teve uma redução de 31% aos 14 dias e de 55% aos 28 dias. Os valores deste grupo foram inferiores aos do grupo normal aos 14 dias e superiores aos 28 dias.

A fosfatase alcalina torna-se elevada no raquitismo, doença de Paget e hiperparatireoidismo. Ela tem sua atividade aumentada em animais diabéticos com estreptozotocina (LIMA *et al.*, 1985).

A fosfatase alcalina (FAL) é uma enzima fosfohidrolase, encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. No fígado, a FAL é secretada pelos hepatócitos e pelas células da mucosa do trato biliar. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FAL, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar. Nos casos de drogas hepatotóxicas, as elevações da enzima são menores (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O sangue é constituído por uma parte líquida, o plasma, que é formado por água, sais minerais, moléculas orgânico-proteicas e por elementos celulares: hemácias ou eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A análise da série vermelha é constituída pela contagem de eritrócitos, dosagem da hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). A série branca, por sua vez, é analisada por meio da contagem total de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos: neutrófilos (bastonetes e segmentados), eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos (MARCONCIN, 2008).

**Tabela 4.17:** Valores médios de leucócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	6,77 $\pm$ 0,40 A	0	8,52 $\pm$ 0,88 A	0	6,37 $\pm$ 0,42 A	0
G 2	5,68 $\pm$ 1,08 A	-16	6,81 $\pm$ 0,77 A	-20	5,58 $\pm$ 0,53 A	-9
G 3	6,55 $\pm$ 0,42 A	-3	6,09 $\pm$ 1,33 A	-28	3,66 $\pm$ 0,40 B	-43*
G 4	5,16 $\pm$ ,39 A	-24	5,96 $\pm$ 0,75 A	-31	3,56 $\pm$ 0,36 B	-44*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os dados da Tabela 4.17, observou-se que o G3 teve uma redução de 28% nos leucócitos aos 14 dias e de 43% aos 28 dias, enquanto que o G4 teve uma redução de 31% aos 14 dias e de 44% aos 28 dias.

O conteúdo de leucócitos em coelhos varia em flutuações no ritmo diurno, variações nutricionais, diferenças na idade (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

Os leucócitos são as células brancas do sangue; desempenham atividade nos processos inflamatório e imunológico dos tecidos através da quimiotaxia, fagocitose, amebismo e diapedese e compreendem os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos e linfócitos (MARCONCIN, 2008).

**Tabela 4.18:** Valores médios de linfócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Linfócitos (%)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	30,46 $\pm$ 2,92 A	0	40,78 $\pm$ 0,74 A	0	77,87 $\pm$ 4,40 A	0
G 2	37,30 $\pm$ 9,54 A	+22	28,56 $\pm$ 3,43 B	-30*	68,21 $\pm$ 4,23 AB	-13*
G 3	30,50 $\pm$ 2,86 A	0	23,23 $\pm$ 0,52 BC	-43*	65,08 $\pm$ 5,33 AB	-16*
G 4	30,10 $\pm$ 3,04 A	-1	18,86 $\pm$ 3,08 C	-64*	59,88 $\pm$ 2,23 B	-23*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados da Tabela 4.18, aos 14 dias o G3 teve uma redução de 43% nos níveis de linfócitos e aos 28 dias redução de 16%. O G4 apresentou uma redução de 64% aos 14 dias e 23% aos 28 dias.

O G1 variou de 40,78%, aos 14 dias, para 77,87% aos 28 dias. Houve uma elevação embora ainda esteja dentro dos faixas de referência.

Para coelhos a faixa normal de linfócitos é entre 39,0%  $\pm$  5 e 68%  $\pm$  15 (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

Linfócitos são os principais tipos celulares da imunidade. Existem como subconjuntos distintos que possuem funções absolutamente diferentes apesar de serem morfológicamente idênticos. Os principais tipos são os T, os B e NK (*natural killers*). A diferenciação entre essas populações só é possível através de meios imunocitoquímicos, pois no esfregaço sanguíneo essas células são indistinguíveis. Os linfócitos B maturam na medula. São as células responsáveis pela produção de anticorpos, cujo papel é neutralizar e promover a eliminação dos antígenos que induzem sua formação (CALDER *et al.*, 2002). Os linfócitos T derivam do timo e são os principais componentes da imunidade celular (MARCONCIN, 2008).

**Tabela 4.19:** Valores médios de monócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Monócitos (%)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	4,70 $\pm$ 1,07 A	0	12,06 $\pm$ 0,46 A	0	27,05 $\pm$ 1,37 A	0
G 2	2,70 $\pm$ 1,32 A	-43	6,35 $\pm$ 1,17 B	-48*	24,50 $\pm$ 4,27 A	-10
G 3	4,66 $\pm$ 1,24 A	-1	8,28 $\pm$ 1,27 B	-31*	24,13 $\pm$ 3,35 A	-11
G 4	2,18 $\pm$ 0,91 A	-54	6,41 $\pm$ 0,41 B	-47*	29,88 $\pm$ 2,37 A	+10

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os dados da Tabela 4.19, o grupo G3 apresentou uma redução de 31% aos 14 dias e redução de 11% aos 28 dias. O G4 apresentou uma redução de 47% aos 14 dias e aumento de 10% aos 28 dias.

Para coelhos a faixa normal de monócitos é entre 1% e 13,4% (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

Os monócitos são as maiores células circulantes e ricos em lisozina, enzima de ação antibacteriana (BEVILACQUA *et al.*, 1992). Sua função primária é a fagocitose de partículas mais volumosas, como fungos e protozoários, mas desempenham também importante papel no processamento de antígenos. Os monócitos circulam por curto período e transformam-se em macrófagos nos tecidos. Monócitos e macrófagos estão envolvidos no desenvolvimento de placas ateroscleróticas nos vasos sanguíneos e nas respostas inflamatória e imunológica (MARCONCIN, 2008).



**Tabela 4.20:** Valores médios de granulócitos ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Granulócitos (%)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	65,56 $\pm$ 3,98 A	0	70,28 $\pm$ 2,21 A	0	13,28 $\pm$ 0,48 A	0
G 2	60,00 $\pm$ 10,12 A	-8	65,10 $\pm$ 3,03 A	-7	11,58 $\pm$ 0,95 AB	-13
G 3	65,28 $\pm$ 3,99 A	-1	67,18 $\pm$ 2,94 A	-4	13,06 $\pm$ 0,44 AB	-2
G 4	67,71 $\pm$ 3,82 A	+3	75,63 $\pm$ 2,79 A	+8	10,23 $\pm$ 1,04 B	-23*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.20, observou-se que aos 14 dias houve pequenas variações na porcentagem dos granulócitos. Aos 28 dias apenas o G4 apresentou uma redução de 23%.

Os granulócitos são divididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos são responsáveis por iniciar e modificar o processo inflamatório agudo, por fagocitar e matar microorganismos. Podem causar danos aos tecidos e exercer efeito citotóxico. Os eosinófilos são parasiticidas, ajudam na regulação das respostas alérgica e inflamatória por inibir a liberação de histamina e serotonina dos mastócitos, detoxificam a histamina, regulam a intensidade das reações IgE e têm atividade fagocítica contra bactérias invasoras. Os basófilos são os leucócitos circulantes mais raros, possuem núcleo segmentado e citoplasma com granações específicas (metacromáticas) de forma e tamanho variados, que quando coradas pelos corantes panóticos apresentam-se de cor violeta (SHINOHARA, 2005; MARCONCIN, 2008).

Em situações de estresse agudo, ocorre uma estimulação do sistema imunológico, já em condições de estresse crônico, o sistema imunológico sofre

supressão. Em diferentes espécies de mamíferos, a contagem absoluta e relativa de neutrófilos segmentados tende a aumentar durante o estresse agudo, como observado em humanos em macaco rhesus e em hamsters (MARCONCIN, 2008).

**Tabela 4.21:** Valores médios de hemácias ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	5,61 $\pm$ 0,28 A	0	6,65 $\pm$ 0,11 A	0	6,00 $\pm$ 0,07 A	0
G 2	5,40 $\pm$ 0,62 A	-4	6,07 $\pm$ 0,30 A	-8	5,87 $\pm$ 0,19 AB	-2
G 3	5,29 $\pm$ 0,22 A	-6	6,11 $\pm$ 0,17 A	-8	5,73 $\pm$ 0,16 AB	-4
G 4	4,95 $\pm$ 0,38 A	-12	5,79 $\pm$ 0,29 A	-13	5,33 $\pm$ 0,12 B	-11*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com a Tabela 4.21, os valores de hemácias no sangue aos 14 dias no G3 reduziu em 8% e aos 28 dias em 4%. O G4 teve redução de 13% aos 14 dias e 11% aos 28 dias.

A faixa normal de hemácias para coelhos é 4,6 a 9,29  $\times 10^6/\text{mm}^3$  (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000). Todos os valores encontrados no experimento estão dentro da normalidade.

Os eritrócitos são produzidos na medula óssea e respondem por 40% de todo o volume sanguíneo. Através da hemoglobina se faz o transporte do  $\text{O}_2$  dos pulmões para os tecidos e de  $\text{CO}_2$  no sentido inverso (MARCONCIN, 2008).

O metabolismo nos eritrócitos é relativamente simples, sendo que a obtenção de energia provém unicamente da glicólise. Seu maior gasto

energético é com a manutenção do equilíbrio iônico intracelular, sobretudo sódio, potássio e cálcio (ANDRADES *et al.*, 2005).

**Tabela 4.22:** Valores médios de hemoglobina ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Hemoglobina (g/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	10,58 $\pm$ 0,24 A	0	12,50 $\pm$ 0,13 A	0	11,88 $\pm$ 0,04 A	0
G 2	10,15 $\pm$ 1,07 A	-4	11,66 $\pm$ 0,45 A	-7	11,91 $\pm$ 0,18 A	0
G 3	10,28 $\pm$ 0,40 A	-3	11,68 $\pm$ 0,27 A	-7	10,90 $\pm$ 0,28 A	-8
G 4	9,83 $\pm$ 0,56 A	-7	10,46 $\pm$ 1,05 A	-17	9,96 $\pm$ 0,33 B	-16*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

A hemoglobina no sangue dos coelhos (Tab. 4.22) aos 14 dias teve redução de 7% e 8% aos 28 dias no G3. Já no G4, aos 14 dias a redução foi de 17% e aos 28 dias de 16%.

A faixa normal de hemoglobina no sangue de coelhos é 11,9 a 18,3 g/dL (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

A hemoglobina adulta humana (A1) é constituída de 4 subunidades (2 $\alpha$  e 2 $\beta$ ) às quais se ligam 4 moléculas de oxigênio. Existem ainda outras formas de hemoglobina, como a hemoglobina fetal (HbF) e hemoglobina A2 que estão presentes em menores quantidades. A afinidade dessas hemoglobinas pelo oxigênio é diferente, assim como alterações na afinidade são provocadas também por diferentes concentrações hidrogeniônicas e concentrações de enzimas, como a que catalisa a formação de 2-3-difosfoglicerato (ANDRADES *et al.*, 2005).

**Tabela 4.23:** Valores médios de hematócrito ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Hematócrito (%)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	33,86 $\pm$ 1,05 A	0	41,10 $\pm$ 0,37 A	0	38,46 $\pm$ 0,44 A	0
G 2	33,46 $\pm$ 3,59 A	-1	38,61 $\pm$ 1,37 AB	-6	38,01 $\pm$ 0,52 A	-1
G 3	33,30 $\pm$ 1,29 A	-2	37,28 $\pm$ 0,99 AB	-9	35,40 $\pm$ 1,06 A	-8*
G 4	30,90 $\pm$ 2,16 A	-8	31,31 $\pm$ 3,42 B	-24*	30,63 $\pm$ 0,72 B	-20*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com a Tabela 4.23, o hematócrito reduziu 9% aos 14 dias e 8% aos 28 dias no G3 e 24% aos 14 dias e 20% aos 28 dias no G4.

O hematócrito é o volume da massa eritróide de uma amostra de sangue, expressa em percentagem ou fração decimal do volume da mesma. Seus resultados são usados em hemoterapia e cirurgia, é o parâmetro preferido nas técnicas de hemodiluição pré e transoperatória, sendo feito no centro cirúrgico. É também a cifra hematimétrica que melhor se correlaciona com a viscosidade sanguínea, sendo usado como parâmetro no tratamento da policitemia vera com flebotomias (FAILACE, 1995).

Os parâmetros hematológicos hemácias, hemoglobina e hematócrito medem a concentração e proporção dos componentes eritróides contidos na amostra de sangue examinada, não expressam necessariamente as quantidades totais no sistema vascular do paciente que a forneceu. Havendo, entretanto mecanismos homeostáticos rápidos e eficientes para a manutenção estável da volemia, costuma haver uma correlação linear entre essas cifras laboratoriais relativas e suas contrapartidas absolutas *in vivo* (FAILACE, 1995).

**Tabela 4.24:** Valores médios de volume corpuscular médio ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Tempo 0		VCM ( $fm^3$ ) Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	62,83 $\pm$ 0,65 A	0	65,50 $\pm$ 1,11 A	0	66,16 $\pm$ 1,07 A	0
G 2	62,33 $\pm$ 1,05 A	-1	63,83 $\pm$ 1,22 AB	-3	66,33 $\pm$ 1,40 A	0
G 3	62,83 $\pm$ 0,90 A	0	61,16 $\pm$ 0,47 BC	-7*	61,83 $\pm$ 1,27 A	-6
G 4	62,66 $\pm$ 1,89 A	-0,5	59,66 $\pm$ 1,14 C	-9*	57,66 $\pm$ 0,66 B	-13*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com a Tabela 4.24 o volume corpuscular médio teve redução de 7% aos 14 dias e 6% aos 28 dias no G3 e 9% aos 14 dias e 13% aos 28 dias no G4.

Os valores de normalidade de VCM para coelhos estão na faixa de 57,6 e 80,3  $fm^3$ . Todos os grupos estão dentro dos valores da normalidade (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

Para a obtenção dos valores de volume corpuscular médio (VCM), os contadores eletrônicos atuais diluem o sangue no sistema e, simultaneamente, contam e medem os eritrócitos pelo princípio do Coulter ou por difração de raios laser. O VCM é o parâmetro mais importante para o diagnóstico diferencial laboratorial dos diversos tipos de anemia, ele varia com a idade em humanos, de 106  $\pm$  5  $fm^3$  no recém nascido, diminui rapidamente para 100  $\pm$  6  $fm^3$  aos 15 dias, continua a decrescer até atingir 76  $fm^3$  aos 6 meses e daí em diante, aumenta lentamente até atingir 89  $\pm$  9  $fm^3$  na puberdade. Mantém-se nessa cifra o restante da vida, sendo igual em homens e mulheres (FAILACE, 1995).

**Tabela 4.25:** Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Tempo 0		HCM (pg) Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	19,93 $\pm$ 0,40 A	0	20,36 $\pm$ 0,39 A	0	20,16 $\pm$ 0,55 A	0
G 2	18,91 $\pm$ 0,41 A	-5	19,30 $\pm$ 0,65 A	-5	20,90 $\pm$ 0,57 A	+3
G 3	19,46 $\pm$ 0,30 A	-3	19,18 $\pm$ 0,38 A	-6	19,08 $\pm$ 0,30 A	-5
G 4	20,03 $\pm$ 0,49 A	0	20,11 $\pm$ 0,78 A	-1	19,61 $\pm$ 0,39 A	-3

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

Os valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) mostrados na Tabela 4.25, não sofreram alterações significativas entre os grupos. No G3 reduziu 6% aos 14 dias e 5% aos 28 dias. No G4 reduziu 1% aos 14 dias e 3% aos 28 dias.

Em coelhos o valor de normalidade para HCM é entre 18,1 e 30,1%. Todos os grupos dentro dos valores de normalidade (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

O HCM é calculado dividindo-se a dosagem de hemoglobina pelo número de eritrócitos presentes no mesmo volume de sangue. O valor de HCM, em ampla faixa, é paralelo ao VCM, isto é, hemácias grandes têm muita hemoglobina, hemácias pequenas têm pouca (FAILACE, 1995).

**Tabela 4.26:** Valores médios de concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	CHCM (g/dL)					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	31,21 $\pm$ 0,51 A	0	32,06 $\pm$ 0,27 AB	0	31,30 $\pm$ 0,17 AB	0
G 2	30,30 $\pm$ 0,18 A	-3	30,23 $\pm$ 0,82 B	-6	31,45 $\pm$ 0,26 AB	0
G 3	30,81 $\pm$ 0,46 A	-1	31,35 $\pm$ 0,48 AB	-2	30,88 $\pm$ 0,29 B	-2
G 4	32,00 $\pm$ 0,75 A	+2	33,73 $\pm$ 0,77 A	+5	32,40 $\pm$ 0,42 A	+4*

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com os dados da Tabela 4.26 o valor da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM), teve redução aos 14 dias de 2% no G3 e G4. Aos 28 dias teve redução de 2% no G3 e aumento de 4% no G4.

Em coelhos o valor de normalidade para CHCM é entre 28,55 e 40,6%. Assim, apesar das variações entre os grupos, todos os grupos estão na faixa da normalidade (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

A concentração da hemoglobina dentro das hemácias é calculada pela fórmula HCM / VCM. Aumentos nos seus valores podem ocorrer na esferocitose e no coma hiposmolar por desidratação das hemácias, o mesmo fenômeno pode ocorrer quando a excesso de EDTA no sangue colhido (FAILACE, 1995).

**Tabela 4.27:** Valores médios da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	RDW					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	16,23 $\pm$ 0,56 A	0	19,13 $\pm$ 0,25 A	0	18,20 $\pm$ 0,19 AB	0
G 2	15,08 $\pm$ 0,28 A	-8	18,45 $\pm$ 0,31 A	-5	17,98 $\pm$ 0,34 AB	-1
G 3	16,05 $\pm$ 0,52 A	-1	17,08 $\pm$ 0,43 B	-11*	17,30 $\pm$ 0,14 B	-5
G 4	15,58 $\pm$ 0,40 A	-4	15,61 $\pm$ 0,19 C	-19*	18,73 $\pm$ 0,38 A	+3

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

Como mostrado na Tabela 4.27, o valor da amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW – red blood cell distribution width) no G3 teve redução de 11% aos 14 dias e 5% aos 28 dias. No G4 teve redução de 19% aos 14 dias e 3% aos 28 dias.

Em humanos, o RDW normal está entre 11% e 14%. Valores mais baixos indicam hemácias mais homogêneas, o que parece ser apenas um extremo da normalidade. Valores superiores a 14% indicam excessiva heterogeneidade das hemácias. Na anemia sideroblástica, em que há um bloqueio na síntese do heme, que varia de hemácia a hemácia, o RDW é extremamente elevado (FAILACE, 1995).



**Tabela 4.28:** Valores médios de plaquetas ( $\pm$  desvio padrão) no sangue total de coelhos aos 0, 14 e 28 dias de tratamento com *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )					
	Tempo 0		Tempo 14		Tempo 28	
	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.	Média $\pm$ dp	% var.
G 1	325 $\pm$ 13 AB	0	319 $\pm$ 8 A	0	307 $\pm$ 63 A	0
G 2	258 $\pm$ 19 B	-21	154 $\pm$ 39 BC	-52*	246 $\pm$ 26 B	-20*
G 3	368 $\pm$ 32 A	+13	287 $\pm$ 44 AB	-11	317 $\pm$ 14 A	+4
G 4	297 $\pm$ 27 AB	-8	124 $\pm$ 49 C	-62*	269 $\pm$ 13 AB	-12

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Grupo com diabetes, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 4,5 mg/Kg e G4: Grupo com diabetes, tratado com a dose de 13,5 mg/Kg.

De acordo com a Tabela 4.28, o G3 teve redução de 11% nas plaquetas aos 14 dias e aumento de 4% aos 28 dias. O G4 teve redução de 62 % aos 14 dias e 12 % aos 28 dias.

As plaquetas são as menores células do corpo e participando processo de cicatrização. São formadas na medula óssea a partir dos megacariócitos. Na corrente sanguínea as plaquetas têm vida média de dez dias e então são removidas pelo baço. Elas atuam para manter a integridade dos vasos sanguíneos e para formar os coágulos (ANDRADES *et al.*, 2005).

No ensaio toxicológico pré-clínico com a fração aquosa de *C. verticillata* nas doses de 5,0 g/Kg, em camundongos Swiss, não foram encontrados alterações hematológicas. Na avaliação da DL<sub>50</sub> foram encontrados valores superiores a 5,0 mg/Kg por via oral (VASCONCELOS *et al.*, 2007). No trabalho de GARCIA *et al.* (2000), o valor de DL<sub>50</sub> para a decocção das folhas de *C. verticillata* foi de 2129 mg/Kg por via intraperitoneal. Estes resultados evidenciam toxicidade aguda relativamente baixa.

## 5. CONCLUSÃO

A glicemia teve redução de 35% com a dose de 4,5 mg/Kg e de 60% com a dose de 13,5 mg/Kg. Nenhuma das doses testadas alterou os níveis plasmáticos de insulina.

A dose de 13,5 mg/Kg reduziu os níveis de triglicerídeos em 72%.

Não foram encontrados alterações hematológicas que evidenciem atividade do extrato de *C. verticillata verticillata* sobre estes parâmetros.

A dose de 13,5 mg/Kg é mais eficaz que a dose de uso popular, 4,5 mg/Kg na redução da glicemia e dos triglicerídeos. Os resultados são promissores quanto à futura utilização do extrato de *C. verticillata verticillata* no controle da glicemia e triglicerídeos.

## CAPÍTULO 5

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DE *Cissus verticillata* (L.)

Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata*

#### 1. INTRODUÇÃO

##### 1.1. Cicatrização

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos de forma sequencial, a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM, 2003).

A cicatrização cutânea é processo complexo, que envolve inflamação, reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz intersticial, eventos realizados por grande número de diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais, influências célula a célula, interação entre células, matriz intersticial e fatores de crescimento, de modo a reparar os tecidos danificados (TENIUS, BIONDO-SIMÕES & IOSHII, 2007).

O processo de cicatrização pode ser dividido em cinco fases principais, que são: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM, 2003).

A cicatrização depende de vários fatores, locais e gerais, como a localização anatômica, tipo da pele, raça, técnica cirúrgica utilizada. O processo de cicatrização em uma mesma espécie varia se a ferida ocorre no

feto, no recém-nascido ou no indivíduo adulto (MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM, 2003).

Ferida é a separação dos tecidos do corpo ou qualquer lesão tecidual, seja epitelial, mucosas ou órgãos, com prejuízo de suas funções básicas. As feridas podem ser produzidas por fatores extrínsecos como a incisão cirúrgica, lesões acidentais, corte e trauma, ou por fatores intrínsecos, como aquelas produzidas por infecção, e as úlceras crônicas, causadas por alterações vasculares, defeitos metabólicos ou neoplasias (WENDT, 2005).

Fatores ambientais e fisiológicos podem causar impacto na evolução da cicatrização, influenciando na qualidade da cicatriz, no tempo de cicatrização e na presença ou não de complicações (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2006).

De um modo geral, o processo de cicatrização é devido a um mecanismo competitivo entre a síntese e a lise de colágeno. Inflamação e infecção são as causas mais importantes de lise excessiva de colágeno, alterando o equilíbrio mencionado e impedindo a união das bordas das feridas (WENDT, 2005).

A idade é fator de risco para o processo de cicatrização. Em idosos, ocorre atraso da reepitelização e diminuição do colágeno, tanto em seres humanos como em animais (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2005).

Os esteróides antiinflamatórios reduzem a força tênsil das feridas fechadas, diminuem a produção de colágeno, a velocidade de epitelização, a neovascularização e inibem profundamente a contração da ferida. Suprimem ainda a inflamação, levando ao aparecimento de macrófagos na área lesada (CORSI *et al.*, 1995).

No processo de cicatrização, a reação inflamatória será nociva se for intensa, pois assim compromete a microcirculação e a proliferação de fibroblastos na região da ferida (BRITO FILHO *et al.*, 2006).

Em pacientes diabéticos ocorre um retardo da cicatrização de feridas devido ao comprometimento do processo de reparação tecidual. Devido a esse fato, as complicações pós-operatórias nesses pacientes são freqüentes (MORAES *et al.*, 2000).

O uso do extrato do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata*) administrado intraperitonealmente, por sete dias, favorece o processo de cicatrização em ratos (BRITO FILHO *et al.*, 2006).

Na avaliação da atividade cicatrizante da calêndula e do óleo de girassol em coelhos, através da retirada cirúrgica da pele e tecido celular subcutâneo, não observou-se diferença significativa quanto ao número de dias para a cicatrização. A média de dias para cicatrização foi de 20,1 para o tratamento 1 (calêndula), 18,9 para o tratamento 2 (óleo de girassol), 19,5 para o tratamento 3 (calêndula e óleo de girassol) e de 20,7 para o tratamento 4 (soro fisiológico). A análise histológica das feridas demonstrou que as mesmas evoluíram para a cicatrização com uma neutrofilia acentuada até o final do processo, sugerindo que, apesar da intensa atividade inflamatória local, o processo de cicatrização ocorreu (WENDT, 2005).

As grandes mudanças ocorridas nas últimas décadas nos conceitos referentes à cicatrização têm mobilizado as indústrias a desenvolver e colocar no mercado produtos cada vez mais específicos que sejam eficazes e

adequados a cada tipo de ferida, em termos de custo/benefício (WENDT, 2005).

## 1.2. Inflamação

A inflamação é uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (CASTARDO, 2007).

Existe correlação entre espécies reativas de oxigênio e processos inflamatórios. Assim, plantas que possuem compostos com atividade antioxidante como os polifenóis e flavonóides, muitas vezes também possuem atividade antiinflamatória (BACALLAO *et al.*, 2002).

O extrato etanólico das folhas de *Conocliniopsis prasiifolia*, popularmente conhecida como “mentrasto”, provocou efeito analgésico central e antiinflamatório em roedores (SILVA *et al.*, 2005).

O óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* possui efeitos antinociceptivo e antiinflamatório por prováveis ações centrais e periféricas, avaliado pelos métodos de contorções abdominais, tempo de lambida da pata e edema de pata (SOUZA *et al.*, 2005).

A proteína C reativa (PCR) é sintetizada pelos hepatócitos, na fase inflamatória aguda, em resposta à infecção. Seu significado no diagnóstico de infecção aguda e destruição tissular está bem estabelecido. Seus níveis se alteram de acordo com a atividade da doença, aumentando a partir de 6 horas de infecção e atingindo pico de elevação dois dias após seu início. Retorna ao normal uma semana depois de começado o tratamento adequado. A PCR

reage sensivelmente à atividade da afecção e à resposta terapêutica em doenças inflamatórias e infecciosas, bem como em condições isquêmicas (CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2006; LARA *et al.*, 2005).

Métodos modernos, quantitativos e rápidos, têm aumentado significativamente o potencial de uso dos níveis séricos de PCR (CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2006).

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a atividade cicatrizante das folhas de *C. verticillata verticillata*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Pesquisar um novo fitoterápico à base de *C. verticillata verticillata* como agente cicatrizante.
- Testar os cremes contendo o extrato das folhas de *C. verticillata verticillata*.
- Dosar os parâmetros sanguíneos proteínas totais, AST, ALT, fosfatase alcalina, albumina e proteínas totais para verificar o efeito do creme à base de *C. verticillata verticillata*.
- Realizar o hemograma completo para acompanhar o efeito do creme à base de *C. verticillata verticillata*.
- Avaliar a histopatologia de pele dos animais.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Preparação do creme**

Com as folhas de *C. verticillata verticillata* foi preparado o extrato glicólico a 30 % de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV edição (1988). Com esse extrato foi preparado creme a 5 % (dose 1) e creme a 10 % (dose 2), que foram aplicados nos coelhos durante o tratamento.

#### **3.2. Animais**

Os animais utilizados foram fornecidos pelo setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se 24 coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, com idade de 55 dias.

Durante o experimento, os coelhos foram mantidos na área experimental do Laboratório de Biofármacos da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Eles ficaram em gaiolas individuais, com temperatura na faixa de 22 a 24°C e um fotoperíodo de 12 horas.

#### **3.3. Período de adaptação**

Durante os primeiros cinco dias os coelhos permaneceram em adaptação na área experimental recebendo 120,0 g de ração comercial peletizada (Soma alimentos) e água *ad libitum*.

#### **3.4. Indução da ferida**

Na indução da ferida os coelhos tiveram parte do dorso depilado. Preparou-se solução de ácido clorídrico 20 % em água destilada. Os animais



foram anestesiados com Xilazina (5 mg/Kg) e Cetamina (20 mg/Kg) por via intramuscular e a solução foi passada, com auxílio de espátula com algodão, uma vez ao dia, sobre a região depilada por período de seis dias. O grupo controle só teve o dorso depilado.

### 3.5. Organização dos grupos experimentais

Após a indução da ferida os animais foram separados aleatoriamente nos grupos experimentais. Cada grupo foi composto por seis animais. A organização dos grupos experimentais está demonstrada na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1:** Grupos de coelhos utilizados no teste de avaliação da atividade cicatrizante das folhas de *C. verticillata verticillata*.

Grupo de coelhos (n=6)	Característica dos animais
Grupo 1	Com ferida, não tratado
Grupo 2	Grupo normal
Grupo 3	Com ferida, tratado com o creme a 5% p/v
Grupo 4	Com ferida, tratado com o creme a 10% p/v

### 3.6. Período de tratamento

O tratamento foi realizado por um período de sete dias. O creme foi aplicado topicamente na região da ferida, de acordo com o grupo experimental, uma vez ao dia, todos os dias no mesmo horário.

### **3.7. Dosagens de parâmetros sanguíneos**

Os parâmetros sanguíneos proteínas totais, AST, ALT, fosfatase alcalina e albumina foram dosados utilizando os kits da Bioclin – Quibasa e o Equipamento Multiparamétrico de Bioquímica - Alizé.

A coleta de sangue foi feita no tempo 07 dias de tratamento. O sangue foi coletado na veia marginal da orelha. As dosagens bioquímicas foram realizadas em plasma coletado em tubo de ensaio contendo heparina. O sangue utilizado na realização do hemograma foi coletado em tubo contendo sal de EDTA 10% (anticoagulante), a fim de se evitar interferência nos parâmetros como, por exemplo, diminuição do número de plaquetas na hora da realização do exame devido à coagulação.

### **3.8. Eutanásia**

No fim do período de tratamento os animais foram eutanasiados utilizando-se Xilazina (5 mg/Kg) e Cetamina (20 mg/Kg) por via intramuscular e posterior punção cardíaca. Foi coletada a pele da região da ferida para confecção das lâminas de histologia.

### **3.9. Análise histológica**

As lâminas para estudo histológico foram confeccionadas no laboratório de Histologia do Departamento de Veterinária da UFV. As laminas foram fotografadas para análise.

### 3.10. Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey e Dunnet.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do processo de cicatrização foi realizada através de dosagens dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, e análise histopatológica da pele dos coelhos.

**Tabela 5.2:** Valores médios de aspartato aminotransferase ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	AST (U/L)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	224 $\pm$ 63 A	0
Grupo 2	160 $\pm$ 27 A	-28
Grupo 3	147 $\pm$ 37 A	-34
Grupo 4	166 $\pm$ 35 A	-26

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

**Tabela 5.3:** Valores médios de alanina aminotransferase ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	ALT (UI)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	143 $\pm$ 27 A	0
Grupo 2	128 $\pm$ 30 A	-10
Grupo 3	122 $\pm$ 28 A	-14
Grupo 4	109 $\pm$ 22 A	-23

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com as Tabelas 5.2 e 5.3, não foram detectadas alterações estatisticamente significativas nos valores de AST e ALT. Notou-se no grupo 3

uma redução de 34% no valor de AST e 14% no valor de ALT. E, no grupo 4 uma redução de 26% no valor de AST e 23% no valor de ALT.

Os níveis plasmáticos de AST aumentam na queimadura grave (LIMA *et al.*, 1985) estando amplamente distribuída no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas. A ALT está presente no fígado, rim e coração (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

**Tabela 5.4:** Valores médios de fosfatase alcalina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Fosfatase alcalina (U/L)	
	Média $\pm$ dp	Varição (%)
Grupo 1	20,88 $\pm$ 4,4 A	0
Grupo 2	18,07 $\pm$ 2,48 A	-13
Grupo 3	22,70 $\pm$ 3,7 A	9
Grupo 4	18,43 $\pm$ 1,5 A	-12

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com os dados da Tabela 5.4, não ocorreram alterações estatisticamente significativas nos valores de fosfatase alcalina. O grupo normal mostrou níveis plasmáticos de fosfatase alcalina 13% menores do que o grupo doente não tratado. O grupo 3 teve aumento de 9% e o grupo 4 teve redução de 12%.

**Tabela 5.5:** Valores médios de proteínas totais ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Proteínas totais (g/L)		
Tempo 7		
Grupo	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	60,08 $\pm$ 3,4 A	0
Grupo 2	66,38 $\pm$ 3,3 A	10
Grupo 3	57,30 $\pm$ 2,9 A	-5
Grupo 4	56,90 $\pm$ 1,2 A	-5

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com os dados listados na Tabela 5.5, não ocorreram alterações estatisticamente significativas nos valores de proteínas totais. Os valores plasmáticos de proteínas totais no grupo normal estava 10% maior que o grupo doente não tratado. Os grupos 3 e 4 tiveram redução de 5%.

Estes resultados demonstraram que os tratamentos com o creme a 5 e 10% não afetaram a capacidade hepática de sintetizar e secretar proteínas plasmáticas, assim como também não afetaram o catabolismo protéico (LIMA *et al.*, 1985).

**Tabela 5.6:** Valores médios de albumina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Albumina (g/dL)		
Tempo 7		
Grupo	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	3,48 $\pm$ 0,09 A	0
Grupo 2	3,69 $\pm$ 0,09 A	6
Grupo 3	3,50 $\pm$ 0,10 A	1
Grupo 4	3,54 $\pm$ 0,06 A	2

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Não ocorreram alterações estatisticamente significativas nos valores plasmáticos de albumina (Tab. 5.6). O valor do grupo normal estava 6% maior

que o grupo doente não tratado. O período de tratamento de sete, considerado agudo, pode explicar o fato de não ter ocorrido alterações estatisticamente significativas.

**Tabela 5.7:** Valores médios de leucócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	6,82 $\pm$ 0,8 A	0
Grupo 2	3,92 $\pm$ 0,7 A	-42
Grupo 3	5,55 $\pm$ 1,1 A	-19
Grupo 4	4,67 $\pm$ 0,3 A	-32

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Em relação aos leucócitos (Tab. 5.7), o grupo normal estava 42% menor. Isso pode ser explicado pelo fato da inflamação que ocorreu nos grupos onde foi induzida a ferida, elevando assim os níveis de leucócitos (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

**Tabela 5.8:** Valores médios de linfócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Linfócitos (%)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	61,10 $\pm$ 4,6 A	0
Grupo 2	51,40 $\pm$ 10,3 A	-16
Grupo 3	60,98 $\pm$ 3,5 A	0
Grupo 4	57,77 $\pm$ 2,0 A	-5

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Os valores de linfócitos (Tab. 5.8), não tiveram alterações estatisticamente significativas e todos os grupos estão dentro da faixa normal para coelhos que é entre  $39,0 \pm 5\%$  e  $68 \pm 15\%$  (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

**Tabela 5.9:** Valores médios de monócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Monócitos (%)	
	Média $\pm$ dp	Tempo 7
Grupo 1	35,50 $\pm$ 2,5 A	0
Grupo 2	24,28 $\pm$ 4,8 A	-32
Grupo 3	30,53 $\pm$ 2,8 A	-14
Grupo 4	33,48 $\pm$ 1,7 A	-6

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Não ocorreram alterações estatisticamente significativas nos valores de monócitos (Tab. 5.9) entre os grupos, entretanto, todos os grupos estão com os valores de monócitos elevados em relação a faixa normal.

Para coelhos a faixa normal de monócitos é entre 1% e 13,4% (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

Esta elevação no número de monócitos pode ser conseqüência do processo inflamatório. Eles possuem a função de fagocitar partículas mais volumosas, e transformam-se em macrófagos nos tecidos. Monócitos e macrófagos estão envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica (MARCONCIN, 2008).

**Tabela 5.10:** Valores médios de granulócitos ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Granulócitos (%)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	11,71 $\pm$ 2,7 A	0
Grupo 2	6,88 $\pm$ 1,5 A	-41
Grupo 3	8,48 $\pm$ 1,2 A	-28
Grupo 4	8,75 $\pm$ 1,9 A	-25

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Em relação aos valores de granulócitos (Tab. 5.10), não ocorreram alterações estatisticamente significativa entre os grupos.

**Tabela 5.11:** Valores médios de hemácias ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	5,64 $\pm$ 0,2 A	0
Grupo 2	4,59 $\pm$ 0,9 A	-19
Grupo 3	5,01 $\pm$ 0,3 A	-11
Grupo 4	5,62 $\pm$ 0,1 A	0

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com os dados da Tabela 5.11, todos os grupos estão dentro da faixa normal para hemácias de coelhos, que é entre 4,6 a  $9,29 \times 10^6/\text{mm}^3$  (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).



**Tabela 5.12:** Valores médios de hemoglobina ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Hemoglobina (g/dL)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	10,38 $\pm$ 0,2 A	0
Grupo 2	8,74 $\pm$ 1,7 A	-16
Grupo 3	9,45 $\pm$ 0,5 A	-9
Grupo 4	10,37 $\pm$ 0,2 A	0

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

A faixa normal de hemoglobina no sangue de coelhos é 11,9 a 18,3 g/dL (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000). Todos os grupos tiveram redução nos níveis de hemoglobina (Tab. 5.12) em relação aos valores normais, entretanto não ocorreram alterações estatisticamente significativas entre os grupos.

**Tabela 5.13:** Valores médios de hematócrito ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Hematócrito (%)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	32,10 $\pm$ 0,7 A	0
Grupo 2	27,03 $\pm$ 5,3 A	-16
Grupo 3	29,62 $\pm$ 1,5 A	-8
Grupo 4	32,45 $\pm$ 0,6 A	1

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com os valores mostrados na Tabela 5.13 não ocorreu alterações estatisticamente significativas entre os grupos em relação ao hematócrito.

**Tabela 5.14:** Valores médios de volume corpuscular médio (VCM) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	VCM ( $fm^3$ )	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	58,20 $\pm$ 1,1 A	0
Grupo 2	49,35 $\pm$ 9,7 A	-15
Grupo 3	59,33 $\pm$ 0,9 A	2
Grupo 4	57,67 $\pm$ 0,6 A	-1

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Os valores de normalidade de VCM para coelhos estão na faixa de 57,6 e 80,3  $fm^3$ . (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000). De acordo com os dados da Tabela 5.14, apenas o grupo 2 estava abaixo da faixa normal, estando 15% menor do que o grupo doente não tratado.

**Tabela 5.15:** Valores médios de hemoglobina corpuscular média (HCM) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	HCM (pg)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	18,77 $\pm$ 0,4 A	0
Grupo 2	15,98 $\pm$ 3,1 A	-15
Grupo 3	18,90 $\pm$ 0,4 A	1
Grupo 4	18,47 $\pm$ 0,31A	-2

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.15, em relação ao HCM, não ocorreram alterações estatisticamente significativas entre os grupos. O grupo normal estava 15% menor do que o grupo doente não tratado e foi o único que não estava dentro da faixa normal.

Em coelhos o valor de normalidade para HCM é entre 18,1% e 30,1%. Todos os grupos dentro dos valores de normalidade (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

**Tabela 5.16:** Valores médios de concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	CHCM (g/dL)	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	32,60 $\pm$ 0,2 A	0
Grupo 2	26,96 $\pm$ 5,3 A	-17
Grupo 3	31,90 $\pm$ 0,5 A	-2
Grupo 4	31,92 $\pm$ 0,4 A	-2

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

Em coelhos o valor de normalidade para CHCM é entre 28,55 e 40,6%. Assim, apesar das variações entre os grupos, todos os grupos estão na faixa da normalidade (FELDMAN, ZINKL & JAIN, 2000).

De acordo com os dados listados na Tabela 5.16, apenas o grupo 2 não estava dentro da faixa normal, estando 17% menor que o grupo 1.

**Tabela 5.17:** Valores médios de amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW) ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	RDW	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	19,62 $\pm$ 0,6 A	0
Grupo 2	19,79 $\pm$ 3,3 A	-14
Grupo 3	19,47 $\pm$ 0,6 A	-1
Grupo 4	18,63 $\pm$ 0,2 A	-5

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

De acordo com a Tabela 5.17, não ocorreram alterações estatisticamente significativas nos valores de RDW entre os grupos.

**Tabela 5.18:** Valores médios de plaquetas ( $\pm$  desvio padrão) no plasma de coelhos após 7 dias de tratamento com o creme de *Cissus verticillata verticillata*.

Grupo	Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	
	Média $\pm$ dp	Variação (%)
Grupo 1	302 $\pm$ 29 A	0
Grupo 2	198 $\pm$ 55 A	-34
Grupo 3	265 $\pm$ 41 A	-12
Grupo 4	258 $\pm$ 12 A	-14

Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais equivalem a tratamentos iguais ao doente. Teste de Dunnett a 5% de significância. \* equivalem a tratamentos iguais. G1: Com ferida, não tratado; G2: Grupo normal; G3: Com ferida, tratado com o creme a 5% e G4: Com ferida, tratado com o creme a 10%.

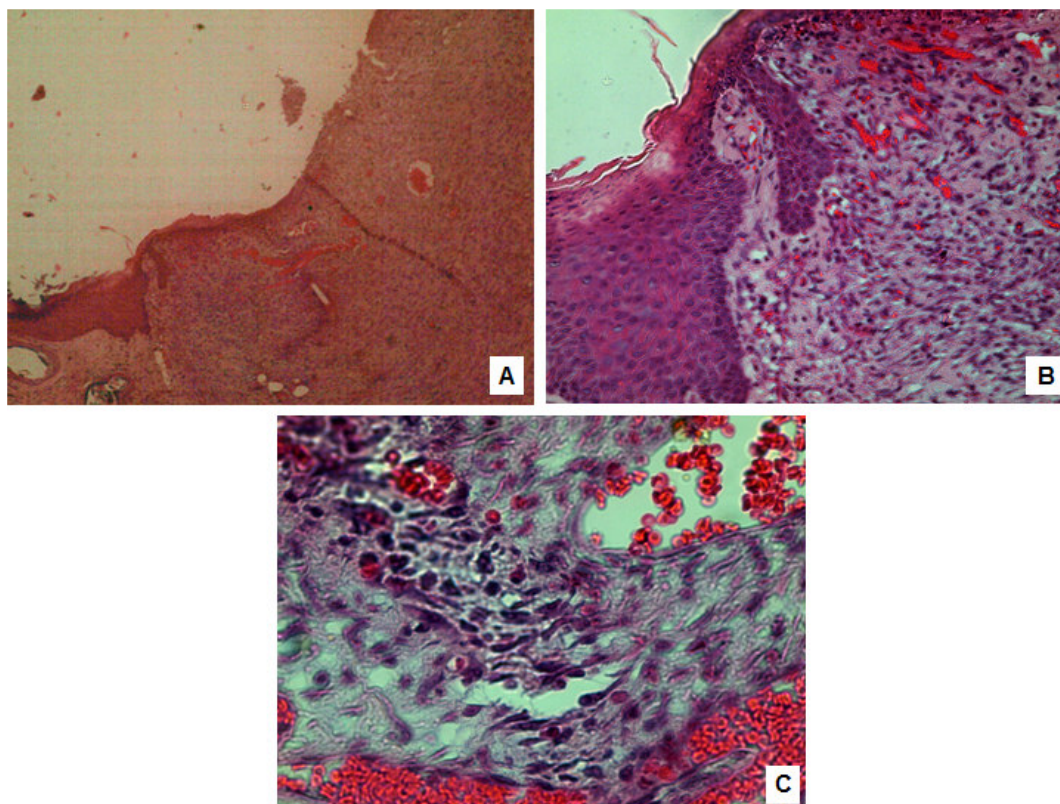
Em relação aos valores de plaquetas (Tab. 5.18), o grupo normal estava 34% menor do que o grupo doente não tratado. Quando ocorre aumento nos níveis de plaquetas aumenta também os riscos de doença trombótica (LIMA *et al.*, 1985).

Para a avaliação do processo de cicatrização também foram analisadas lâminas com cortes histológicos de pele da região da ferida. As lâminas foram confeccionadas a partir de corte transversal da epiderme dos coelhos, com 5  $\mu\text{m}$  de espessura, e coradas com hematoxilina-eosina.

Foram analisados o grupo com ferida, não tratado (Fig. 5.1), grupo normal (Fig. 5.2), grupo com ferida, tratado com o creme a 5% (Fig. 5.3) e grupo com ferida, tratado com o creme a 10% com o extrato de *C. verticillata verticillata* (Fig. 5.4).

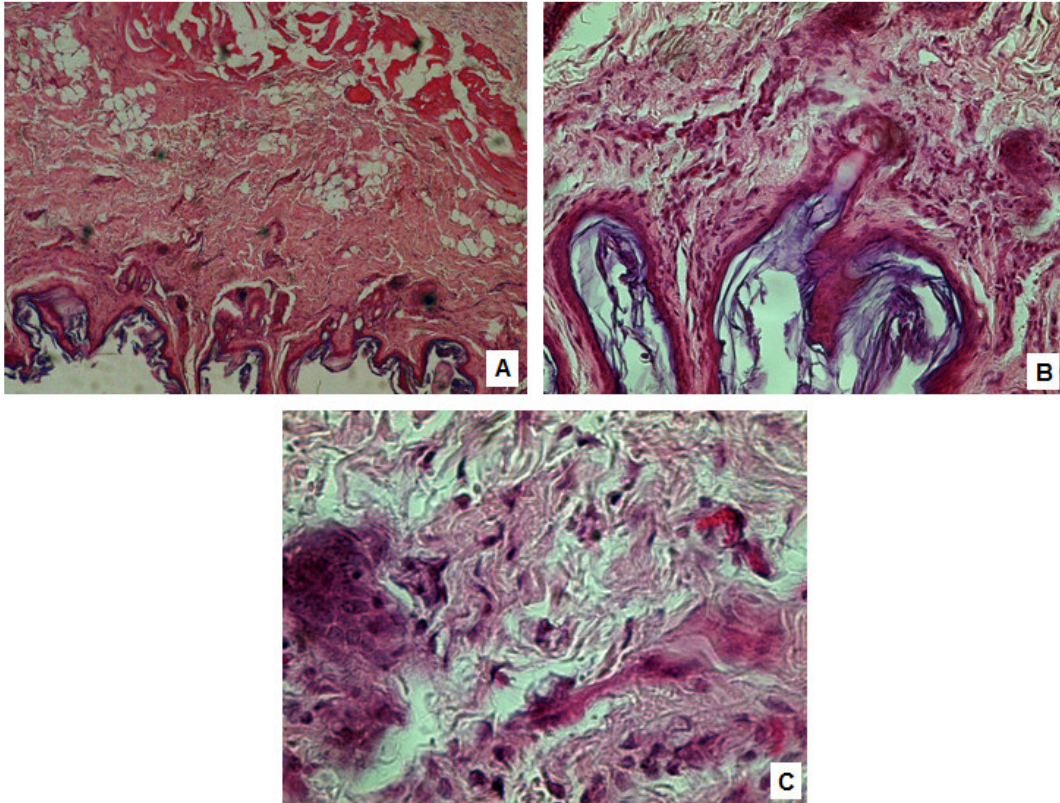
No grupo com ferida, não tratado (Fig. 5.1). observou-se grande número de hemácias, aumento de neutrófilos. Houve um edema significativo, infiltrado

inflamatório misto, ocasionais focos de hemorragia e vasos hiperemiados. Presença do tecido de granulação, e com fibrose, ectasia capilar, infiltrado inflamatório mononuclear difuso.



**Figura 5.1:** Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, não tratado. A: aumento 10X, B: aumento de 40X e C: aumento 100X.

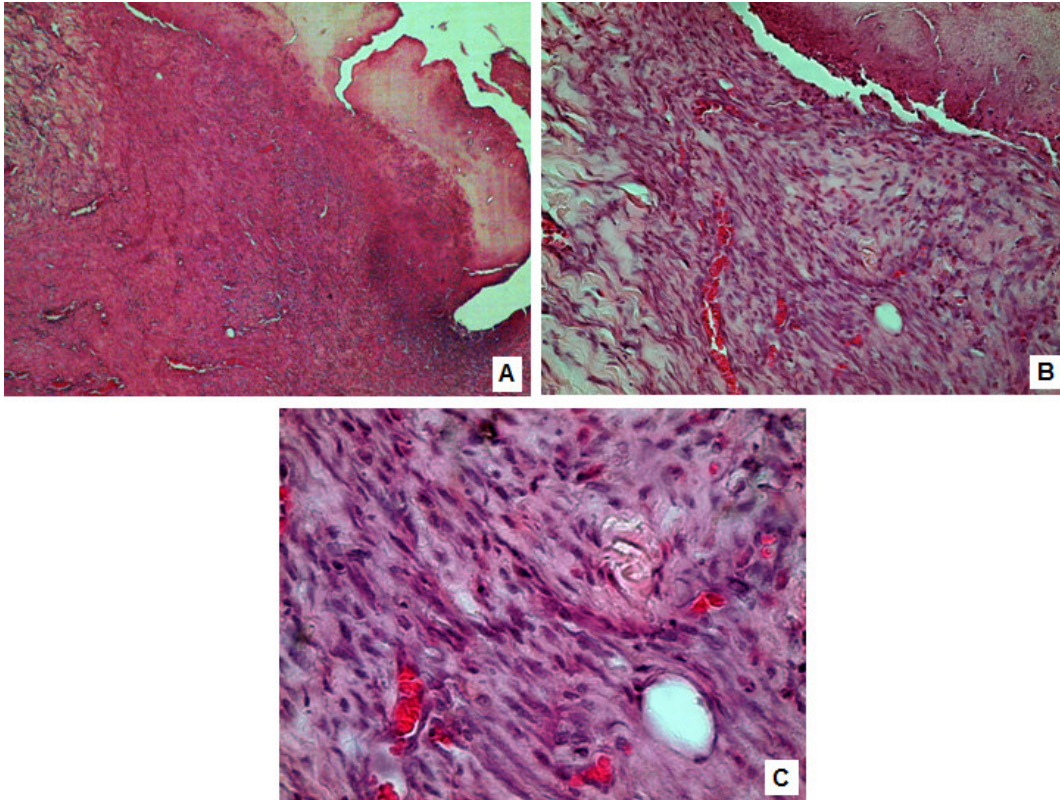
A estrutura histológica da epiderme integra de coelhos, está apresentada na Figura 5.2.



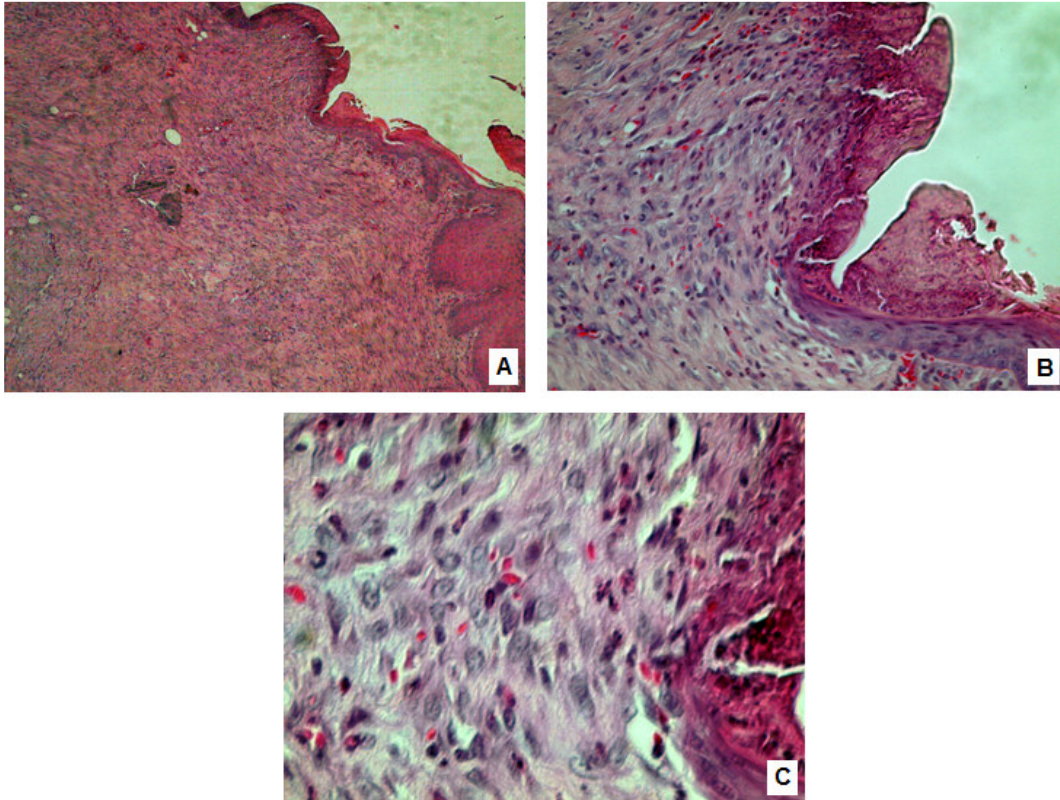
**Figura 5.2:** Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo normal. A: aumento 10X, B: aumento de 40X e C: aumento 100X.

De acordo com as laminas de histopatologia pode-se verificar que o tratamento com o creme com extrato de *C. verticillata verticillata* atuou favoravelmente no processo de cicatrização nos coelhos. Observou-se nos grupos tratados com o creme a 5 e 10%, síntese de colágeno aumentada, menor infiltração de neutrófilos, redução de células em espuma, aumento da camada de elastina, redução da hemorragia (hiperemia) (Figs. 5.3 e 5.4).

Comparando os tratamentos verificou-se que ocorreu maior síntese de colágeno no tratamento com o creme a 10% (Fig. 5.4), ou seja, com a maior dose do fitoterápico. Esse resultado demonstra que a espécie *C. verticillata verticillata* atua favoravelmente no processo de cicatrização através da estimulação da síntese de colágeno.



**Figura 5.3:** Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com creme de *C. verticillata verticillata* a 5% p/v. A: aumento 10X, B: aumento de 40X e C: aumento 100X.



**Figura 5.4:** Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com creme de *C. verticillata verticillata* a 10 % p/v. A: aumento 10X, B: aumento de 40X e C: aumento 100X.

No extrato hidroalcoólico de *C. verticillata* foi identificado taninos (DOMINICI *et al.*, 2003) que podem atuar no processo de cicatrização observado nesse estudo.

As cascas do barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius) apresentam efeito adstringente e tem ação farmacológica como cicatrizante de feridas e úlceras, o que se deve a riqueza de taninos. As propriedades adstringentes do barbatimão permitem que as proteínas das células superficiais da mucosa e dos tecidos lesados desprotegidos se precipitem, formando um revestimento protetor contra a multiplicação bacteriana, promovendo uma ação anti-séptica (EURIDES *et al.*, 1996).



Já a presença de flavonóides na espécie *C. verticillata verticillata*, como a rutina, que foi identificada por CLAE, pode ter atividade farmacológica no processo inflamatório.

A rutina, quercetina e hesperidina na dose de 80 mg/Kg por via intraperitoneal inibe a fase aguda e crônica em modelos experimentais de inflamação. A rutina foi mais ativa na fase crônica (GUARDIA *et al.*, 2001).

O flavonóide quercetina possui atividade antiinflamatória em altas concentrações, bloqueando a ciclooxigenase e lipooxigenase, enquanto em baixas concentrações a lipooxigenase é primariamente inibida. A enzima ciclooxigenase regula a produção de prostaglandinas, sendo essa enzima o alvo de fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) (GUARDIA *et al.*, 2001).

O extrato etanólico de própolis, rico em flavonóides, teve concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) de 650 mg/Kg (vo) em ratos, inibindo significativamente o processo inflamatório desencadeado pela carragenina (REIS *et al.*, 2000).

## **5. CONCLUSÃO**

O extrato de *C. verticillata verticillata* auxiliou o processo de cicatrização das feridas cutâneas através da redução do processo inflamatório e aumento na síntese de colágeno e não promoveu alterações clinicamente importantes nos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

No futuro esta espécie vegetal poderá ser utilizada como fitoterápico na cicatrização, sendo necessários, ainda, novos estudos.

## REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17(1), p. 114-140, 2007.
- AHMAD, M.; AKHTAR, M. S.; MALIK, T.; GILANI, A. H. Hypoglycaemic action of the flavonoid fraction of *Cuminum nigrum* seeds. **Phytoterapy Research**, v.14(2), 103-106, 2000.
- ALIGIANIS N.; KALPOUTZAKIS E.; MITAKU S.; CHINOU I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ALIPI, M. H.; PICHARDO, J. M. **Vitaceae - *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis, Tripa de vaca**. 2007. Disponível em <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/vitaceae/cissusverticillata/fichas/ficha.htm>. Acesso: julho 2007.
- AMARAL F. M. M.; COUTINHO D. F.; RIBEIRO M. N. S.; OLIVEIRA M. A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 27-30, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, vol. 29, p. 543-548, 2006.
- ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(2), p. 231-235, 2007.
- ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 78, p. 145-149, 2001.

ANDRADES, B.; SOUZA, C.E.; MINAMI, D.N.; BRUNHARO, G.M.; NERY, L.F.C.; LORANDI, V. **Sangue: uma aplicação clínica**. Florianópolis, SC: UFSC, 2005, 50p. (monografia).

ARAUJO, A. J.; LORDELLO, A. L. L.; MAIA, B. H. L. N. Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). **Revista Visão Acadêmica**, v. 2(2), p. 81-84, 2001.

ARIAS, T. D. **Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso**. Washington: Organización Panamericana de La Salud/Organización Mundial de La Salud, 1999.

ASGARY, S.; NADERI, G.; SARREFZADEGAN, N.; GHASSEMI, N.; BOSHTAM, M.; RAFIE, M.; AREFIAN, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73(5), p. 223-226, 1999.

ASSOLINI, F. A.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T.; FERRAZ, C.; ALENCAR, S. M. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal Food Technology**, v.9 (3), p. 209-215, 2006.

ATUALIZAÇÃO BRASILEIRA SOBRE DIABETES. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro : Diagraphic, 2006. 140p.

BACALLAO, L. C.; DOMÍNGUEZ, D. M. R.; GÓMEZ, L. V. G.; ÁNGEL, M. H. Plantas con propiedades antiinflamatorias. **Rev Cubana Invest Bioméd**, v.21(3), 2002.

BARA M. T. F.; RIBEIRO P. A. M.; ARANTES M. C. B.; AMORIN L. L. R. S. S. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(2), p. 211-215, 2006.

BARBOSA, W. L. R.; SANTOS, W. R. A.; PINTO, L. N.; TAVARES, I. C. C. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.13-15, 2002.

BELTRAME, F. L.; PESSINI, G. L.; DORO, D. L.; DIAS FILHO, B. P.; BAZOTTE, R. B.; CORTEZ, D. A. G. Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45(1), 2002.

BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético de *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE). **Química Nova**, v.6, p.783-785, 2001.

BELTRAME, F.; FERREIRA, A.; CORTEZ, D. Coumarin Glycoside from *Cissus sicyoides*. **Natural Product Research**, v. 16(4), p. 213-216, 2002.

BEVILACQUA, F.; BENSOUSSAN, E.; JANSEN, J. M.; CASTRO, F. S.; CARVALHAES, L. P. Fisiopatologia dos distúrbios hematológicos. In: BEVILACQUA, F.; BENSOUSSAN, E.; JANSEN, J. M.; CASTRO, F. S.; CARVALHAES, L. P. **Fisiopatologia Clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. p.523-560.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12(2) p. 123-130, 1999.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ALCANTARA, E. M.; DALLAGNOL, J. C.; YOSHIZUMI, K. O.; TORRES, L. F. B.; BORSATO, K. S. Cicatrização de feridas: estudo comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33(2), p. 74-78, 2006.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S. O.; ZAZULA, A. D.; BIONDO-SIMÕES, R. O processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento. Estudo da cicatrização de anastomoses intestinais, em ratos **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20(1), p. 113-119, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos**

**fitoterápicos.** Brasília, DF, 2004. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&Word>. Acesso: Junho 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos.** Brasília: Ministério da Saúde, 2006.148 p.

BRITO FILHO, S. B.; MATIAS, J. E. F.; STAHLKE JÚNIOR, H. J.; TORRES, O. J. M.; TIMI, J. R. R.; TENÓRIO, S. B.; TÂMBARA, E. M.; CARSTENS, A. G.; CAMPOS, R. V.; MYAMOTO, M. Análise da cicatrização na linha alba com uso de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21(3), p. 76-88, 2006.

CALDER, P. C.; YAQOUB, P.; THIES, F.; WALLACE, F. A.; MILES, E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, v. 87(1), p. 31-48, 2002.

CARVALHO JÚNIOR, L. H.; SANTOS, R. L.; MENDONÇA, C. J. A.; CAMPOS, C. T.; ANDRADE, M. A. P. Avaliação da variação da temperatura cutânea, proteína c reativa e velocidade de hemossedimentação na artroplastia total do joelho primária, isenta de complicações. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14(3), p. 161-164, 2006.

CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; Mukherjee, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 86(1), p. 11-16, 2005.

CARVALHO, L. M.; CASALI, V. W. D.; SOUZA, M. A.; CECON, P. R. Disponibilidade de água no solo e crescimento de Artemísia. **Horticultura Brasileira**, v. 21(4), p. 726-730, 2003.

CARVALHO, V. A.; LIMA, L. C. O. Qualidade de kiwis minimamente processados e submetidos a tratamentos com ácido ascórbico, ácido cítrico e

cloreto de cálcio. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 37 (5), p. 679-685, 2002.

CASTARDO, J. C. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *Garcinia gardneriana* (planchon & triana) zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos**. Curitiba, PR: UFP, 2007. (dissertação).

CASTILHOS, T. S.; GIORDANI, R. B.; HENRIQUES, A. T.; MENEZES, F. S.; ZUANAZZI, J. A. Avaliação *in vitro* das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(2), p. 209-214, 2007.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; JORGE, A. P.; SOUSA, E.; HORST, H.; WOEHL, V. M.; PIZZOLATTI, M. G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F. R. M. B. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, vol. 163, p. 177-191, 2006.

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

CHACRA, A. R. Efeito fisiológico das incretinas. **Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine**, vol. 6(7B), p. 613-617, 2006.

CHAVES, F. R.; ROMALDINI, J. H. Diabetes mellitus tipo 2. **Revista Brasileira de Medicina**, vol.59, p. 83-90, 2002.

CHEEKE, P. R. Alimentación y nutrición Del conejo. Zaragoza (España): Acribia S. A., 1995. 429p.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute, Reference method for both dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard M27-A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standard**, Wayne, PA, 2002.

CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em [http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso\\_atual\\_2002.pdf](http://www.diabetes.org.br/educacao/docs/Consenso_atual_2002.pdf). Acesso: dezembro 2006.

CONSTANTIN; M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A.T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J. P.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by CG/MS and C-NMR. **Planta Med**, v. 63, p. 771-773, 2001.

CORDEIRO C. H. G.; CHUNG M. C.; SACRAMENTO L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15(3), p. 272-278, 2005.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

CORSI, R. C. C.; CORSI, P. R.; PIRANAS, M.; FAE, E.; JORGE, D. Factors which compromise wound healing: a review. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 85(2), p. 47-53, 1995.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CYSNE, J. B.; CANUTO, K. M.; PESSOA, O. D. L.; NUNES, E. P.; SILVEIRA, E. R. Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará - Northeast of Brazil. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 16(6B), p. 1378-1381, 2005.

DAS, A. K.; MANDAL, S. C.; BANERJEE, S. K.; SINHA, S.; SAHA, B. P.; PAL, M. Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in

Streptozotocin induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 628-629, 2001.

DAVIS, Stephen N.; GRANNER, Daryl K. Insulina, hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino. In: GILMAN, Alfred Goodman; HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003. Cap.61, p.1263-1289.

DESMUUKH, A. B.; PATEL, N. J.; PATEL, R. J. Hydroxyl radical mediates the augmented angiotensin II responses in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. **Pharmacology**, v. 79(2), p. 122-128, 2007.

DOMINICI, A. J. C.; REGO, T. J. A.; SILVA, A.Z.; ROCHA, C.C.; LIMA, E.B. Abordagem Fitoquímica de *Cissus sicyoides* L. (vitaceae). In: **54º Congresso Nacional de Botânica**, Belém, PA, 2003.

DÔRES R. G. R. **Análise morfológica e fitoquímica da Fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.)**. Viçosa, MG: UVF, 2007, 375p. (tese).

DRUCKER, D. J. Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, vol. 26(10), p. 2929-2940, 2003.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v. 7, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(2), p. 446-452, 2006.

DYNTAR, D.; SERGEEV, P.; KLISIC, J.; AMBUHL, P.;SCHAUB, M. C.; DONATH, M. Y. High glucose alters cardiomyocyte contacts and inhibits myofibrillar formation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, vol. 91(5), p. 1961–1967, 2006.



ELSNER, M.; TIEDGE, M.; GULDBAKKE, B.; MUNDAY, R.; LENZEN, S. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. **Diabetologia**, vol. 45, p. 1542-1549, 2002.

ESCOSTEGUY C. C. Tópicos Metodológicos e Estatísticos em Ensaio Clínicos Controlados Randomizados. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 72(2), p. 139-43, 1999.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M. E.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTE, M. C. S.; TRONCOSO NETO, N. S.; CAMPOS, V. A.; LEMOS, R. C.; SILVESTRINI JUNIOR, P. L. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius), **Revista da FZVA Uruguaiana**, v. 2/3(1), p. 30-40, 1995/1996.

FACH, A.; GREGEL, B.; SIMIONATTO, E.; DA SILVA, U. F.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F.; LINARES, C. E.; ALVES, S. H. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. **Planta Med**, v. 68, p. 836-839, 2002.

FAILACE, R. **Hemograma – manual de interpretação**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. 198p.

**Farmacopéia Brasileira**. 4.ed., v. 1 São Paulo: Atheneu, 1988.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Veterinary hematology**. 5ª Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2000, 1344p.

FERREIRA, M. P. NISHIJIMA, C. M.; SEITO, L. N.; DOKKEDAL, A. L.; LOPES-FERREIRA, M.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 170–174, 2008.

FERREIRA, S. Aspectos epidemiológicos do diabetes mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETTO, A.

**Diabetes na Prática Clínica.** Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008. Mod. 1, Cap. 1. Disponível em <http://www.diabetesebook.org.br/capitulo/aspectos-epidemiologicos-do-diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade/>. Acesso: abril, 2008.

FERREIRA, W. M. A coprofagia em coelhos. **Cadernos técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 2, p. 41-54, 1987.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia.** 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1488p.

FONSECA, A. L. **Interações medicamentosas.** Rio de Janeiro: EPUB, 2000. 502p.

GABBAY, M.; CESARINI, P. R.; DIB, S. A. Diabetes melito tipo 2 na infância e adolescência: revisão da literatura. **Jornal de Pediatria**, vol.79(3), p. 201-208, 2003.

GALIZIA, M. S.; WAITZBERG, D. L. Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 16(2), p. 79-89, 2001.

GARCIA, M. D.; QUILEZ, A. M.; SAENZ, M. T.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, M. E.; PERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 395-400, 2000.

GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; PUERTA, R.; QUILEZ, A.; FERNADEZ, M. A. Antibacterial activity of *Agave intermixta* and *Cissus sicyoides*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 71-73, 1999.

GARCIA, X.; CARTAS-HEREDIA, L.; LORENZANA-JIMENEZ, M.; GIJON, E. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on guinea-pig aortic rings. **Gen. Pharm.**, v. 29(3), p. 457-462, 1997.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco**, v. 56, p. 683–687, 2001.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap.1, p.13-28.

GUGGENHEIMER, J.; MOORE, P. A.; ROSSIE, K.; MYERS, D.; MONGELLUZZO, M. B.; BLOCK, H. M.; WEYANT, R.; ORCHARD, T. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. **Oral surgery oral medicine oral pathology**, v. 89(5), p. 570-576, 2000.

GUPTA, A. K.; KOHLI, Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and intraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and evaluation of combination antifungal activity. **British Journal of Dermatology**, v. 149, p. 296-305, 2003.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115p.

HABER, E. P.; CURI, R.; CERVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45(3), p.219-27, 2001.

HANLEY, A. J. G.; WILLIAMS, K.; FESTA, A.; WAGENKNECHT, L. E.; D'AGOSTINO Jr, R. B.; KEMPF, J.; ZINMAN. B.; HAFFNER. S. M. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes. **Diabetes**, vol. 53, p. 2623-2632, 2004.

HANNAN, J. M. A.; ALI, L.; KHALEQUE, J.; AKHTER, M.; FLATT, P. R.; ABDEL-WAHAB, Y. H. A. Aqueous extracts of husks of *Plantago ovata* reduce hyperglycaemia in type 1 and type 2 diabetes by inhibition of intestinal glucose absorption. **British Journal of Nutrition**, vol. 96, p. 131-137, 2006.

HATTON, M.W.; SOUTHWARD, S.M.; ROSS, OUELLET, B.; RICHARDSON, M.; WINOCOUR, P.D. Comparative metabolism of plasminogen glycoforms I and II in the alloxan-diabetic rabbit. **American Journal of Physiology**, v.269(6), p. 1017-1023, 1995.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HELDWEIN, C. G.; PEREIRA, R. P.; HEIZMANN, B. M.; ROCHA, J. B. T. In vitro antioxidant activity of *Senecio crassiflorus* (Poir.) DC. var. *crassiflorus*. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

HERRMAN, C. E.; SANDERS, R. A.; KLAUNIG, J. E.; SCHWARZ, L. R.; WATKINS, J. B. Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in streptozotocin-induced diabetic rats. **Toxicological Sciences**, vol. 50, p. 146-151, 1999.

HILALY, J. E.; LYOUSSI, B. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 80, p. 109-113, 2002.

HNATYSZYN, O.; MIÑO, T.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. The hypoglycemic effect of *Phyllanthus sellowianus* fractions in streptozotocin-induced diabetic mice. **Phytomedicine**, v. 9, p.556-559, 2002.

INDICADORES E DADOS BÁSICOS BRASIL. **Organização Pan-Americana de Saúde**. Rede Interagencial de Informações para Saúde, 2005.

JAYPRASKA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seeds (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, v. 73, p. 285-290, 2001.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P. S. M. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 97–103, 2006.

KIMMEL, B.; INZUCCHI, S. E. Oral agents for type 2 diabetes: an update. **Clinical Diabetes**, vol.23(2), p.64-76, 2005.

KOSKI, R. R. Practical review of oral antihyperglycemic agents for type 2 diabetes mellitus. **The Diabetes EDUCATOR**, vol.32(6), p. 869-876, 2006.

KRENISKY, J. M.; LUO, J.; REED, M. J.; CARNEY, J. R. Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a Peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 1137-1140, 1999.

LAGOR, W. R.; GROH, E. D.; NESS, G. C. Diabetes alters the occupancy of the hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280(44), p. 36601–36608, 2005.

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2(45), 2006. (<http://www.ethnobiomed.com/content/2/1/45>).

LARA, C. N.; GUEDES, E. C.; VASSALO, C. C.; CARVALHO JÚNIOR, L. H. Avaliação da velocidade de hemossedimentação e da proteína C-reativa em pacientes submetidos à artroplastia total do quadril. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 40(4), p.175-181, 2005.

LEBAS, F. Alimentación de los conejos. In: **Alimentación de los animales monogástricos**. 1 ed., Madrid: Mundi-Prensa, p. 95-101, 1985.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. Princípios de Bioquímica. 4 ed. Editora Sarvier, 2007.

LESSA, I. Níveis séricos de creatinina: hipercreatininemia em segmento da população adulta de Salvador, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, vol. 7(2), p. 176-186, 2004.

LIBERATO, S.C. **Efeito do flavonóide narigenina em ratos e coelhos com diabetes induzida por aloxano**. Viçosa, MG: UFV, 2001, 194p. (tese).

LIM, S. S.; JUNG, Y. J.; HYUN, S. K.; LEE, Y. S.; CHOI, J. S. Rat lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* stamens. **Phytotherapia Research**, v. 20(10), p. 825-830, 2006.

LIMA, A. **Métodos de laboratório aplicados à ciência**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985, 549p.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(2), p. 197-201, 2006.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, vol. 16(3), p.305-314, 2003.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; OLIVEIRA, M. G. A.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; GOMES, S. M.; FILHO, J. T. S. Determinação da atividade de lípase na presença de morina, naringenina, naringina e rutina. **Ciência e Agrotecnologia**, vol. 23(3), p. 626-631, 1999.

LIU, I. M.; CHI, T. C.; HSU, F. L.; CHEN, C. F.; CHENG, J. T. Isoferulic acid as active principle from the rhizome of *Cimicifuga dahurica* to lower plasma glucose in diabetic rats. **Planta Medica**, v. 65, p. 712-714, 1999.

LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M.; PÉREZ, O. C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco-ubí). **Revista Cubana de Farmácia**, v. 34(2), p. 120-124, 2000.

LOMBARDI, J. A. **O gênero Cissus L. emend descoings (Vitaceae) na América do Sul**. Campinas, SP: USP, 1994, 355p. (tese).

LOMBARDI, J. A. Vitaceae-Generos Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. **Flora Neotropica**, Monograph 80, The New York Botanical Garden, 2000.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LIMA, L. R. P.; LEÃO, M. A.; LIMA, E. Q. Efeito de diferentes doses de rutina sobre as concentrações de albumina, creatinina, uréia e ácido úrico no soro de coelhos. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 86(1), p. 35-38, 2005.

MACEDO M.; FERREIRA A. R. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 45-47, 2004.

MACHADO, J. A. G.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Quantificação de flavonóides em culturas *in vitro* de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5(2), p. 432-434, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos disciplinares. **Química Nova**, v. 25(3), p. 429-438, 2002.

MAGINA, M. D. A.; JOHANN, S.; RESENDE, M. A.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Antifungal activity of three *Eugenia* species. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78(4), p. 393-410, 2003.

MARCONCINI, S. A. **Respostas fisiológicas em cães suplementados com lecitina de soja e lecipalm®: estudo sobre os parâmetros metabólicos, bioquímicos e hematológicos.** Curitiba, PR: UFP, 2008, 121p. (dissertação).

MAUVAIS-JARVIS, F.; VIRKAMAKI, A.; MICHAEL, M. D.; WINNAY, J. N.; ZISMAN, A.; KULKARNI, R. N.; KAHN, C. R. A model to explore the interaction between muscle insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction in the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, vol. 49, p. 2126-2134, 2000.

MORAES, S. P.; CHAVES, F. R.; BANCI, S.; ROVER, P. A.; GEORGETTI, F.; REIS NETO, J. A. Zinco e cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 27(5), p. 394-399, 2000.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações.** 4ª Ed. Porto Alegre: Robe Editorial, 2003, 419p.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41 (2), p. 122-142, 2005.

NOGUEIRA, R. A. Coprofagia em coelhos. **Informe Agropecuário**, v. 159, p. 14-15, 1989. 1989.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; SILVA, R. S. Casca de banana: uma possível fonte de infecção no tratamento de fissuras mamilares. **Jornal de Pediatria**, v. 79(3), p. 221-226, 2003.

OBEN, J. E.; ENYEGUE, D. M.; FOMEKONG, G. I.; SOUKONTOUA, Y. B.; AGBOR, G. A. The effect of *Cissus quadrangularis* (CQR-300) and *Cissus* formulation (CORE) on obesity and obesity-induced oxidative. **Lipids in Health and Disease**, v.6(4), 2007.

OGA, S.; BASILE A. C. **Medicamentos e suas interações.** São Paulo: Atheneu, 1999. 199p.



OLIVEIRA, A. B. *Cissus verticillata* (VITACEAE): **Informações etnofarmacológicas e anatomia dos órgãos vegetativos**. Viçosa, MG: UFV, 2006, 75p. (tese).

OLIVEIRA, J. E. P. Conceito, classificação e diagnóstico do diabetes mellitus. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus – clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. Cap.2, p.7-18.

OLIVEIRA, P. E. S.; SILVA, T. B. C.; SILVA, A. P. F.; CONSERVA, L. M. Radical scavenging and antioxidant activities of phenolic compounds and extracts from fruits of *Triplaris Americana* L. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

OLIVEIRA, P. V. A.; FACHIN, A. P.; ROSSETI, E. S.; FRANÇA, S. C.; PIETRO, R. C. I. R.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; PEREIRA, P. S. Antifungal activity of *Serjania erecta* Radlk. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

OLIVEIRA, T. T.; GOMES, S. M.; NAGEM, T. J.; COSTA, N. M. B.; SECOM, P. R. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Revista de Nutrição**, vol. 15(1), p. 45-51, 2002a.

OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A.; FONSECA, C. C. A.; PEREIRA, H. J. V.; SANTOS, M. H.; LIMA, E. Q. Atividade antidiabética de *Bauhinia sacra*, corantes naturais, ácido cinâmico e 7-epiclusianona. **NewsLab**, v. 72, p. 172-190, 2005.

OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LOPES, R. M.; MORAES, G. H. K.; FERREIRA Jr, D. B.; SILVA, R. R.; MAIA, J. R. S. Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol.36(4), p. 213-215, 2004.

OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; MESSAGE, D.; TINOCO, A. L. A.; MAGALHÃES, N. M.; SILVA, J. F.; HUERTAS, A. A. G.; PINTO, J. G.; PEZERICO, G. B.; TSIOMIS, A. C. Efeito de antocianina e própolis em diabetes induzida em coelhos. **Revista de medicina Ribeirão Preto**, v. 35, p. 464-469, 2002b.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. Brasília, 2003. Disponível em [http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d\\_cronic.pdf](http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/d_cronic.pdf). Acesso: dezembro 2006.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. São Paulo, SP: USP, 127p. (dissertação).

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.37, p.15-20, 2003.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICCOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotecnica**, v. 30(4) , p. 731-738, 2006.

PEREZ GUTIÉRREZ, R. M.; CERVANTES, C. H.; ZAVALA, S. M. A.; SANCHEZ, A. J.; PEREZ, G. S.; PEREZ, G. C. Isolation and hypoglycemic activity of 5, 7, 3'-tryhydroxy-3,6,4'-trimetoxiflavona from *brickellia veronicaefolia*. **Phytomedicine**, v. 7, p. 25-29, 2000.

PIGANELLI, J. D.; FLORES, S. C.; CRUZ, C.; KOEPP, J.; BATINIC-HABERLE, I.; CRAPO, J.; DAY, B.; KACHADOURIAN, R.; YOUNG, R.; BRADLEY, B.; HASKINS, K. A Metalloporphyrin-based superoxide dismutase mimic inhibits adoptive transfer of autoimmune diabetes by a diabetogenic T-cell clone. **Diabetes**, v. 51, p. 347-355, 2002.

QUENTAL C.; SALLES F. S. Ensaio clínico: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9(4), p. 408-24, 2006.

QUILEZ, A. M.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; PUERTA, R. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56(9), p. 1185-1189, 2004.

RADÜNZ L.L.; MELO E. C.; MACHADO M. C.; SANTOS R. R.; SANTOS R. Secagem em camada delgada de folhas de *Lippia sidoides* Cham. In: **30th. Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**; Foz do Iguaçu, PR, 2001.

RATES S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11(2), p. 57-69, 2001.

REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T.; CAPUTO, L. R. G.; PATRICIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J.; CHIEFF, A. L.; BASTOS, J. K. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 9(10), p. 43-52, 2000.

RIBEIRO, J. N.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; FERREIRA JÚNIOR, D. B.; PINTO, A. S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38(1), p. 23-27, 2006.

ROCHA, J. L. L.; BAGGIO, H. C. C.; CUNHA, C. A.; NICLEWICZ, E. A.; LEITE S. A. O.; BAPTISTA, M. I. D. K. Aspectos relevantes da interface entre diabetes mellitus e infecção. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, vol. 46(3), p. 221-229, 2002.

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

SAEG. **Sistema para análises estatísticas**. Versão 9.1, Viçosa, MG: UFV, 2007. (programa de computador).

SALGADO, P. R. **Fenóis totais no cafeeiro em razão das fases de frutificação e do clima**. Piracicaba, SP: USP, 2004, 60 p. (dissertação).

SANTOS, H. B.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; VASCONCELOS, T. H. C.; PEREIRA, F. S. B.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G.; SANTOS, E. B. Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(1), p. 70-76, 2008.

SARTORELLI, D. S.; CARDOSO, M. A. Associação entre carboidratos da dieta habitual e diabetes mellitus tipo 2: evidências epidemiológicas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, vol. 50(3), p. 415-426, 2006.

SAUTTER, C. K. **Avaliação da presença de resveratrol em suco de uva**. Santa Maria, RS: UFSM, 2003, 134p. (dissertação).

SCHEDHTER, M.; GUIMARÃES-WALKER, A. P. Diabetes mellitus e doenças infecciosas. In: OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus – clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. Cap.17, p.199-215.

SCHWEDHELM, E.; MAAS, R.; TROOST, R; BOGER, R. H. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42(5), p. 437-59, 2003.

SHINOHARA, E. M. G. **Células Sanguíneas**. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br>. Acesso em: agosto 2006.

SILVA FILHO, A. A.; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; SOUSA, J. P. B.; GREGORIO, L. E. Phytochemical study and comparative evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and brazilian green propolis. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII**

**Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM];** São Pedro, SP, 2007.

SILVA M. I. G.; GONDIM A. P. S.; NUNES I. F. S.; SOUSA F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(4), p. 455-62, 2006.

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

SILVA, L.; CARREIRA, R. C.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; YOUNG, M. C. M.; LADEIRA, A. M. Crescimento e análise do potencial antifúngico em plantas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9(1), p. 73-79, 2007b.

SILVA, L.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; MAYWORM, M. A. S.; LADEIRA, A. M. Bicyclergmacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(3), p. 361-367, 2007a.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate.** Piracicaba, SP: USP, 2002, 87p. (dissertação).

SILVA, M. G.; OLIVEIRA, F. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; OLIVEIRA, T. M. L.; DINIZ, M. F. F. M. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24(4), p. 533-537, 2005.

SILVA, P. B.; GREGOL, A. F. O.; MEDEIROS, A. C.; DUARTE, M. C. T.; SANTOS, C. Antimicrobial activity of extracts from *Pyrostegia venusta*. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting**

on **Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; ALBINO, L. F. T.; ALMEIDA, M. R.; MORAES, G. H. K.; PINTO J. G. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina, **ALAN**, v. 51 (3), p. 258-264, 2001.

SILVA, T. B. C.; SOUZA, V. K. T.; SILVA, A. P. F.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M. Radical scavenging and antioxidant activities of flavonols from leaves of *Tournefortia bicolor* S. W. (Boraginaceae). In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

SILVA. N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais e a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12(1), p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap.18, p.468-495.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 81-86, 2002.

SKYLER, J. S. Diabetes Mellitus: Pathogenesis and Treatment Strategies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p.4113-4117, 2004.

SOARES, D. C.; BARBOSA, W. L. R. Obtenção do Perfil Cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a Detecção de Flavonóides como Marcadores nas Soluções Extrativas de *Cissus Verticillata* L. **Revista Científica da UFPA**, v. 5, 2007. Disponível em <http://www.cultura.ufpa.br/rcientifica/cabecalho.php?conteudo=10.83>). Acesso: maio, 2007.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41(1), 2005.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap.13, p. 289-326.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30(2), p. 351-355, 2007.

SOUSA, O. V.; SOARES JÚNIOR, D. T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R. G.; GATTASS, C. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14(01), p. 11-14, 2004.

SOUZA J. R. P.; TAKAHASHI L. S. A.; YOSHIDA A. E.; GUIRAUD M. C.; ROCHA J. N. Tempo de armazenamento e temperatura na porcentagem e velocidade de germinação das sementes de camomila. **Ciência Rural**, v. 37(4), p. 982-986, 2007.

SOUZA, A.; De PAULA, A. C. C. F. F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Effects of irradiance on non-structural carbohydrates, growth, and hypoglycemic activity of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. (Poaceae). **Brazilian Journal Biology**, v. 64(3B), p. 697-706, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 640p.

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

TAMBASCIA, M. A.; GELONEZE NETO, B.; ELIASCHEWITZ, F. G.; GROSS, J.; PIMAZONI NETTO, A. Novas perspectivas para o tratamento do diabetes tipo 2: incretinomiméticos e inibidores da DPP-IV – Posicionamento Oficial SBD 2007 Nº 3. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETTO, A. **Diabetes na Prática Clínica**. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008. Mod. 4, Cap. 2. Disponível em <http://www.diabetesebook.org.br/capitulo/novas-perspectivas-para-o-tratamento-do-diabetes-tipo-2-incretinomimeticos-e-inibidores-da-dpp-iv-posicionamento-oficial-sbd-2007-no-3/>. Acesso: abril 2008.

TENIUS, F. P.; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; IOSHII, S. O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82(2), p. 141-149, 2007.

TOLEDO, F. G. S.; SNIDERMAN, A. D.; KELLEY, D. E. Influence of hepatic steatosis (Fatty Liver) on severity and composition of dyslipidemia in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, vol. 29(8), p. 1845-1850, 2006.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem Cell Biol**, v. 122, p. 339-352, 2004.

TROPICOS. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em <http://www.tropicos.org>. Acesso: março 2007.



UCHÔA, V. T.; CARVALHO, A. A.; SOUSA, C. M. M.; CHAVES, M. H.; SANT'ANA, A. E. G. Evaluation of the antioxidizing activity of isolated *Ximenia americana* L. extracts and compounds. In: **1<sup>ST</sup> Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

VASCONCELOS, T. H. C. **Ensaio toxicológico pré-clínicos e clínicos com as folhas de *Cissus sicyoides* L. (VITACEAE)**. João Pessoa, PB: UFPB, 2004, 140p. (tese).

VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(4), p. 583-591, 2007.

VELLOZO, L.; PIMAZONI NETTO, A. Fisiologia e fisiopatologia das células beta: implicações clínicas e terapêuticas. In: ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETTO, A. **Diabetes na Prática Clínica**. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2008. Mod. 1, Cap. 3. Disponível em <http://www.diabetesebook.org.br/capitulo/fisiologia-e-fisiopatologia-das-celulas-beta-implicacoes-clinicas-e-terapeuticas/>. Acesso: abril, 2008.

VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, L. K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F. J. A. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v.4, p.9-15, 2004.

VICENTINI, V. E. P.; Camparoto, M. L.; Teixeira, R. O.; Mantovani, M. S. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23(2), p. 593-598, 2001.

VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos

tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17(3), p. 384-387, 2007.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. Zaragova: Acribia, 1979. 499p.

WENDT, S. B. T. **Comparação da eficácia da calendula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais**. Curitiba, PR: UFP, 2005. (dissertação).

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, vol. 27(5), p. 1047-1053, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap. 23, p. 577-614.