



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



CAROLINA MORAIS ARAUJO

**Análise da eficácia da polpa do fruto e do extrato das folhas de amoreira (*Morus nigra* L.)
sobre a modulação de marcadores metabólicos e marcadores do estado redox celular em
um modelo experimental de diabetes tipo 1.**

Ouro Preto

2015

CAROLINA MORAIS ARAUJO

Análise da eficácia da polpa do fruto e do extrato das folhas de amoreira (*Morus nigra* L.) sobre a modulação de parâmetros bioquímicos e marcadores do estado redox celular em um modelo experimental de diabetes tipo 1.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica

Orientadora: Prof. Dr^a Daniela Caldeira Costa.

Co-orientador: Prof. Dr Marcelo Eustáquio Silva.

Ouro Preto

2015

A663a

Araujo, Carolina Morais.

Análise da eficácia da polpa do fruto e do extrato das folhas de amoreira (*Morus nigra* L.) sobre a modulação de marcadores metabólicos e marcadores do estado redox celular em um modelo experimental de diabetes tipo 1 [manuscrito] / Carolina Morais Araujo. - 2015.

131f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Diabetes. 2. Stress (Fisiologia). 3. Proteinase. 4. Antioxidantes. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Silva, Marcelo Eustáquio. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 678.048

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Análise da eficácia da polpa do fruto e do extrato das folhas de amoreira (*Morus nigra* L) sobre a modulação de parâmetros bioquímicos e marcadores do estado redox celular em um modelo experimental de diabetes tipo 1"

Aos vinte e três dias do mês de Outubro de 2015, às 9:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Carolina Morais Araújo**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROVAR** a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
(UFOP)



Prof.ª Dr.ª Cintia Lopes de Brito Magalhães
(UFOP)



Prof.ª Dr.ª Helen Hermans Miranda
Hermsdorff (UFV)



Prof.ª Dr.ª Maria do Carmo Gouveia
Peluzio (UFV)



Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 23/10/2015



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - ICEB II - sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto

Campus: Universidade Municipal do Cruzeiro | CEP: 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Tel: 55 31 3559 2630 | E-mail: sbiot@nupeb.ufop.br | www.nupec.ufop.br/ciob

Este trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Bioquímica Metabólica ICEB/NUPEB/UFOP**, **Laboratório de Nutrição Experimental ENUT/UFOP** e no *Departments of Pediatrics & Pharmacology, Cardiovascular Research Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (bolsista PDSE, Processo nº: 99999.005988/2014-04).

“Só existe uma maneira de evitar as críticas: não fazer nada, não dizer nada e não ser nada”.
(Aristóteles)

Dedico este trabalho a Deus, à Virgem Maria, a minha família, a minha mãe e ao meu irmão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Prof^a. Daniela Caldeira Costa Calsavara meu eterno agradecimento à oportunidade, a confiança em mim depositada, os ensinamentos oferecidos e aos desafios a mim propostos durante esses anos de convívio. A você, dedico meus sinceros agradecimentos e meu total reconhecimento pela oportunidade de realizar esse trabalho ao lado de alguém que transpira sabedoria; meu respeito e admiração pela sua serenidade, paciência, carinho, pela capacidade de análise do perfil de seus alunos, tratando a cada um de acordo com sua personalidade e limitações! Reconheço seu profissionalismo e exemplo a ser seguido, pelo incentivo nos momentos bons e ruins e também o seu imenso Dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva, por abrir as portas de seu laboratório para mim, por toda a ajuda, ensinamentos, paciência, disponibilidade e atenção.

Jamais poderia deixar de escrever algumas palavras de agradecimento ao estimado Prof. Dr. André Talvani, meu eterno agradecimento. Sei que sem a sua ajuda eu não conseguiria realizar parte do meu doutoramento. Muito obrigado por enviar minhas amostras para a *University of Alberta*, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela disponibilidade, pelo profissionalismo e disposição em ajudar, sendo meu mediador no doutorado sanduiche.

Agradeço ao prof. Dr. Richard Schulz e a todos os pesquisadores do *Laboratory of Pharmacology* pelo apoio e ensinamentos, não apenas nos experimentos de bancada, mas também na língua e cultura canadense.

Aos professores doutores Gustavo Henrique Bianco de Souza e Geraldo Célio Brandão à grande colaboração, parceria, por toda a ajuda e ensinamentos na caracterização química dos extratos. Sem a colaboração de vocês não seria possível a realização destes ensaios que muito enriqueceram o nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima, pela colaboração, disponibilidade, exemplo e ensinamentos, meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso e todo laboratório de Imunoparasitologia – UFOP pela paciência e empréstimos realizados.

Ao Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro, por todo ensinamento, disciplina, prontidão em ajudar por me iniciar na carreira científica.

Ao laboratório de Produtos Naturais UFMG, coordenado pela professora Alaíde Braga de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Virgem Maria, por nunca me abandonarem e sempre iluminarem meu trabalho, minha vida, meus caminhos e meus sonhos.

À minha família, agradeço de coração aos Moraes e aos Araujo, pelo amor e apoio incondicionais. Vocês são o máximo!

Aos meus queridos avós e padrinhos, Amelia e Waldemar, por serem sempre presentes em minha vida! Sempre acreditando em mim, dando força e amor. Trazendo-me conforto, alegria e esperança nos momentos tristes. Por nunca me deixarem desistir!

À minha sensacional mãe Nelma, por sempre acreditar em mim, me apoiar, amar, ensinar, suportar e incentivar nos momentos de alegria e tristeza, e principalmente pelo exemplo de vida, força e fé. E por viver meus sonhos comigo! Ao Renato, meu amado irmão e companheiro, por fazer parte de minha vida, exemplo de força, perseverança, garra e por alegrá-la sempre. Você é meu orgulho! Foi por vocês que cheguei até aqui! Vocês são minha base, obrigada por aceitarem as mudanças e a ausência, obrigada por tanto amor!

Ao meu pai João Alberto por interceder por mim junto de DEUS.

À tia Selma, pelo amor, zelo, paciência, conversas, por me mostrar que sempre devemos buscar nossos sonhos, principalmente pelo exemplo de vida, força e fé.

Aos meus tios Mauro, Maurício, Marcelo, Marina, Lili, Neucimar e Silvana vocês são indispensáveis em minha vida! Obrigado por todo apoio!

Ao meu namorado, Saulo, por sonhar junto comigo, pelo amor, companheirismo, confiança, por ser a razão enquanto eu sou só emoção, apoio e pelo amável sorriso sempre! Por cuidar de mim, me ouvir nos dias mais difíceis e aguentar diariamente meus estresses!

Agradeço em especial, Joamyr, Glaucy, Aline, Lorena, Karine, Pedro, Ana Carolina, Ana Carla, Frank, Keila, Rafaella, Simone, Aureliano, vocês foram fundamentais para o bom desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela ajuda na bancada, pelos divertidos cafés na cantina. Por ser mais que colegas de trabalho, serem realmente amigos/irmãos! Muito obrigada pela paciência e amizade. Foi um prazer e uma honra trabalhar e conviver com vocês!

Agradeço de todo meu coração a Milla, Juninha, Ju Moraes, Lelé, João Augusto, Elisa, Livia, Lelê, Eriquinha, Alessandra, Karen, Renatinha, Ana e Fernanda, obrigada pela boa convivência e risadas, sem vocês esse trabalho não seria o mesmo! Cada um de vocês foi muito importante!

Araujo, C.M.

Agradeço aos verdadeiros e maravilhosos irmãos que ganhei no Canadá, Vivi, Adriano, Anny, Catarina, Gabi, Guilia, João Victor, Evita e todos os “Brazucas” e agregados! Vocês são presentes de DEUS! Amo vocês do fundo do meu coração!

A todos os professores e alunos do LABIIN, LBM, LBBM, LH, LFC em especial Karina, Roberta, Nat, Érica, Estér, Bajú, Francine, Victor e Guilherme.

Agradeço ao PIVIC cantina pelas risadas, momento de desabafo e descontração, em especial Ana Maria Sampaio Rocha, Léo e Fábio, nosso orientador.

Nildes e Toninho, obrigada pela amizade sincera! Sempre presentes quando precisei!

Agradeço ao Zezinho, Lourdinha, Lunara, Luana e Maria, por me permitirem fazer parte de sua família aqui em Ouro Preto, com acolhimento total e incondicional!

Ao Biotério da UFOP e a todos os seus funcionários, em especial à Érika e Lorena pelo companheirismo, paciência e dedicação.

Ao Sr. Jair e Clodoaldo pela inigualável ajuda e cuidado com os animais, pelos ensinamentos, pela amizade e boa companhia no biotério!

Aos colegas e professores do NUPEB, pela amizade, colaboração, vivência e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

Laboratório de Fitotecnologia;

Laboratório de Produtos Naturais – UFMG (Dra. Alaíde Braga)

Laboratório de Imunologia da Inflamação;

Laboratory of Pharmacology - University of Alberta.

Laboratório de Biologia Molecular e Celular;

Laboratório de Biologia e Tecnologia de micro-organismos;

Laboratório de Imunoparasitologia;

Obrigado pelo suporte necessário para a realização deste trabalho.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no **Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM)** e **Laboratório de Nutrição Experimental (Labnex)** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto com o auxílio financeiro da CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFOP.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT	XIX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	21
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 – DIABETES E SAÚDE PÚBLICA	24
2.2 – CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES.....	25
2.3 – ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS	26
2.4 – DIABETES, EXTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	28
2.5 – METALOPROTEINASES DE MATRIZ.....	33
2.6 – ANTIOXIDANTES DA DIETA E SUA IMPORTÂNCIA NO PADRÃO ALIMENTAR	35
2.7 – AMORA (<i>MORUS NIGRA</i>).....	36
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS	40
3.1 – OBJETIVO GERAL	40
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 – MATERIAL BOTÂNICO	40
4.1.1 – Obtenção da polpa amora	40
4.1.2 – Obtenção do extrato das folhas de amoreira	40
4.2 – ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS	41
4.2.1 – Curva de calibração do ácido gálico	41
4.2.2 – Diluição e leitura das absorbâncias das amostras.....	41
4.2.3 – Expressão dos resultados do ensaio de polifenóis totais	42
4.3 – CAPACIDADE ANTIXODANTE <i>IN VITRO</i> CONTRA O RADICAL DPPH	42
4.3.1 – Curva de calibração do trolox	42
4.3.2 – Diluição e leitura das absorbâncias das amostras.....	43
4.4 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE CLAE-EM	43
4.5 – EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	44
4.5.1 – Delineamento experimental	44
4.5.2 – Indução do diabetes experimental com aloxano	45
4.5.3 – Eutanásia e coleta de tecidos	45
4.6 – DETERMINAÇÃO DE INSULINA SÉRICA	45
4.7 – ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO E PLASMA	46
4.8 – ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES	46
4.8.1 – Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	46
4.8.2 – Atividade da catalase (CAT).....	47
4.8.3 – Glutaciona total e razão GSH/GSSG.....	47
4.8.4 – Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).....	48
4.8.5 – Atividade da Glutaciona Redutase (GR)	49
4.9 – Proteínas Totais	51
4.10 – PROTEINA CARBONILADA	52
ONDE A É A SUBTRAÇÃO DA ABSORBÂNCIA DO TUBO A (AMOSTRA) PELA ABSORBÂNCIA DO TUBO C (CONTROLE), C É A CONCENTRAÇÃO, B É O CAMINHO ÓPTICO E E É O COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR.	53
4.11 – PARÂMETROS HISTOLÓGICOS.....	53
4.12 – WESTERN BLOTTING E ZIMOGRAFIA	53
4.12.1 – Preparo do homogenato do tecido	53

4.12.2 – SDS-PAGE e Western Blotting	54
4.12.3 – Zimografia	55
4.12.4 – Densitometria das bandas para Western Blotting e Zimografia	55
4.13 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS	57
5.1 – ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ESPECTRAL DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i>	57
5.2 – DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXANTE <i>IN VITRO</i> DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i>	63
5.3 – AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E PESO DO FÍGADO	64
5.4 – GLICEMIA E INSULINEMIA	64
5.5 – PERFIL LIPÍDICO	65
5.6 – ANÁLISE DA FUNÇÃO HEPÁTICA	67
5.7 – ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL	68
5.8 – EFEITO DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS SOBRE MARCADORES DO <i>STATUS REDOX</i> NO FÍGADO	69
5.8.1 – Perfil antioxidante	69
5.8.2 – Glutaciona total e razão GSH/GSSG	70
5.9 – AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO EM PROTEÍNAS	72
5.10 – ANÁLISE HISTOLÓGICA	73
5.11 – MMP-2 E MMP-9	74
CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO	76
CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES	87
CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	101

LISTA DE SIGLAS

- ALT – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
ADA – American Diabetes Association
AGEs – Produtos de glicação avançada
ALX – Aloxano
C – Grupo controle
CAT – Catalase
CEUA – comitê de ética em pesquisa no uso de animais
CLAE-DAD-EM – cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de iodo acoplada a espectrometria de massas
Cu/Zn-SOD – Superóxido dismutase cobre/zinco
D – Grupo diabético
DAG – Diacilglicerol
DF – Grupo diabético tratado com extrato das folhas
DM – Diabetes *mellitus*
DNA – Ácido desoxiribonucleico
DP – Grupo diabético tratado com polpa
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECSOD – Superóxido dismutase extracelular
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ERNs – Espécies reativas de nitrogênio
GOD – Glicose oxidase
GPx – Glutaciona peroxidase
GR – Glutaciona redutase
GSH – glutaciona reduzida
GSH/GSSG – Razão glutaciona reduzida/glutaciona oxidada
GSSH – glutaciona oxidada
H• – Radical hidrogênio
HOCl – Ácido hipocloroso
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IDF – International Diabetes Federation
i.p – Intraperitoneal
KDa – Kilodalto

Araujo, C.M.

MMP-2 – Metaloproteinase de matriz tipo 2

MMP-9 – Metaloproteinase de Matriz tipo 9

Mn-SOD – Superóxido dismutase manganês

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NO – Óxido nítrico

$O_2^{\bullet -}$ – Radical superóxido

OH^{\bullet} – Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

ONOO⁻ – Peroxinitrito

pH – Potencial hidrogeniônico

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SDS – dodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

TEA – Trietanolamina, 2, 2', 2''-nitilotrietanol, trihidroxietilamina

TIMP – Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Flavonoides identificados na polpa de *Morus nigra* 59
Tabela 2: Flavonoides identificados no extrato das folhas de *Morus nigra*..... 61
Tabela 3: Médias dos pesos inicial, final e dos fígados dos grupos experimentais. 64
Tabela 4: Avaliação da eficácia do tratamento com a polpa e extrato das folhas de amoreira.86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes (GPx – glutathione peroxidase; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; GR – glutathione reductase; GSH e GSSG – formas reduzida e oxidada da glutathione, NADPH e NADP+ - formas reduzida e oxidada da nicotinamida adenina-dinucleotídeo fosfato)	30
Figura 2: Mecanismos enzimáticos de defesas antioxidantes	31
Figura 3: Foto da árvore (A) e frutos (B) de amora (Morus nigra)	37
Figura 4: Foto da folha de amora (Morus nigra) em um pequeno comércio em Monte Verde-MG.....	38
Figura 5: Perfil da polpa de Morus nigra.....	58
Figura 6: Perfil do extrato das folhas de Morus nigra	60
Figura 7: Estruturas químicas dos compostos encontrados na composição da polpa e do extrato das folhas de Morus nigra. Fonte: Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.	62
Figura 8: Capacidade antioxidante da Morus nigra	63
Figura 9: Avaliação das concentrações de glicose no soro (A) e insulina no plasma (B).....	65
Figura 10: Concentrações séricas de colesterol total (A) e HDL (B)	66
Figura 11: Triacilgliceróis (A) e fração aterogênica (B).....	66
Figura 12: Atividade da alanina aminotransferase (ALT) (A) e da aspartato aminotransferase (AST) (B).....	67
Figura 13: Concentração sérica de creatinina (A) e uréia (B)	68
Figura 14: Perfil Antioxidante.....	69
Figura 15: Status Redox.....	70
Figura 16: Atividade da Glutathione Peroxidase (U/mL) (A), Atividade da Glutathione Redutase (U/mL) (B),	71
Figura 17: Concentrações de Proteína Carbonilada.....	72
Figura 18: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado	73
Figura 19: Análise da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9. Imagem representativa das bandas de MMP-2.....	74
Figura 20: Avaliação da expressão proteica de MMP-2. Imagem representativa das bandas de MMP-2 e GAPDH	75
Figura 21: Proposta para o efeito antioxidante do extrato de folha de Morus nigra..	85

RESUMO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Esta desordem leva a uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, induz danos às células β -pancreáticas e a elevação da atividade de metaloproteinases de matriz tipo 2 (MMP-2) pelo aumento do estresse oxidativo, prejudicando a produção de insulina e, conseqüentemente, a manutenção da normoglicemia. A *Morus nigra* L. possui altas concentrações de metabólitos secundários e, principalmente, possui altas concentrações de fenólicos totais e flavonoides. Com base na composição química da *Morus nigra*, o seu potencial antioxidante pode ser um fator importante para modular o estresse oxidativo induzido pelo diabetes. Neste contexto, nossa meta principal foi avaliar a eficácia da polpa e do extrato das folhas de amoreira na modulação de parâmetros bioquímicos, atividade de MMP e enzimas antioxidantes em um modelo experimental de diabetes tipo 1. Para tal, este estudo foi subdividido em ensaios *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, objetivou-se caracterizar o perfil fitoquímico e antioxidante da polpa e do extrato das folhas de amoreira. *In vivo*, objetivamos verificar o potencial hipoglicemiante da polpa e extrato das folhas de amoreira bem como a modulação de parâmetros bioquímicos e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em um modelo experimental de diabetes tipo 1. Os resultados da caracterização fitoquímica sugeriram que a polpa de amora apresenta um conteúdo de flavonoides distinto daqueles encontrados no extrato das folhas. Também, observamos que o extrato das folhas apresentou uma maior quantidade de compostos fenólicos e uma maior capacidade de neutralização do radical DPPH quando comparado à polpa de amora. Para a realização dos ensaios *in vivo*, 32 ratas Fischer, fêmeas, albinas foram distribuídas em quatro grupos experimentais: controle, diabético, diabético tratado com polpa e diabético tratado com extrato das folhas da amoreira. O DM foi induzido por injeção intraperitoneal de aloxano na concentração de 135 mg/kg. Os animais foram tratados durante 30 dias com a polpa ou extrato das folhas de *Morus nigra* L.. Ao final do tratamento as ratas foram eutanasiadas e as amostras de fígado e de sangue foram coletadas para as análises de parâmetros bioquímicos e metabólicos. Nossos resultados mostraram que o tratamento de ratas diabéticas com o extrato das folhas diminuiu a hiperglicemia induzida pelo diabetes e aumentou as concentrações séricas de insulina. Este efeito não foi observado no tratamento com a polpa de amora. Além disto, o tratamento com a polpa e extrato das folhas de amora foi

Araujo, C.M.

responsável pela diminuição na atividade de superóxido dismutase (SOD) e um aumento na atividade de catalase (CAT), restabelecendo a razão SOD/CAT as concentrações do controle. Observamos também que o tratamento com a polpa e o extrato das folhas de amora diminuiu as concentrações de proteína carbonilada em relação ao grupo diabético não tratado. Em relação às metaloproteinases, não encontramos diferenças significativas na atividade de metaloproteinase de matriz tipo 9 (MMP-9), mas houve uma diminuição na expressão e atividade de MMP-2 em ratas diabéticas tratadas com o extrato das folhas de amora. Estes resultados, analisados em conjunto, sugerem que o extrato das folhas da amoreira é mais eficaz no controle glicêmico e na modulação de MMP-2 do que a polpa de amora em modelo experimental de diabetes tipo 1.

Palavras-chave: *Morus nigra* L., Diabetes, Estresse Oxidativo, Metaloproteinases de Matriz, Enzimas Antioxidantes, Ratas Fischer.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by a chronic disorder of hyperglycemia and alterations in metabolism of carbohydrate, lipid and protein. This disorder decreases antioxidant enzyme activities, damages pancreatic β -cells and induce the elevation of activities's matrix metalloproteinase type 2 (MMP-2) by increases oxidative stress, consequently reducing insulin production and impacting negatively in the maintenance of normoglycemia. *Morus nigra* L. contains high levels of secondary metabolites, mainly phenolics and flavonoids. Based on the chemical composition of *Morus nigra* L., its antioxidant potential, may be an important factor for modulating the oxidative stress induced by diabetes. This work was subdivided in assays in vitro and in vivo. The objective in vitro, was characterize the phytochemical and antioxidant profile of pulp and leaves extract of mulberry. The assay in vivo, verified the potential hypoglycemic of leaves extracts and of mulberries's pulp and analyze the modulation of biochemical parameters and enzymes related with the stress oxidative in an experimental model of diabetics type 1. The results of phytochemical characterization suggested that the pulp and the extract of leaves have distinct phenolic compounds, the leaves has more phenolic compounds than the pulp of mulberry. The results also show that the leaves extract has a neutralization capacity bigger than a pulp of mulberry. In the assays in vivo were used 32 Fischer rats. In the experiment 32 rats, female, albino were distributed in four experimental groups: control, diabetic, diabetic treated with pulp and diabetic treated with *Morus nigra* leaf extract. The DM was induced by intraperitoneal injection of aloxano monohidratano (135 mg/kg). The animals were treated during 30 days with *Morus nigra* pulp or leaf extract. In the end of treatment the rats were euthanized, and the samples of liver and blood were collected for analysis of biochemical and metabolic parameters. The results suggests that treatment of diabetics rats with leaf extract reduced the hyperglycemia induced by diabetes and increased the serum levels of insulin. The treatment with pulp and leaf extract of *Morus nigra* was responsible for decrease in activity of superoxide dismutase (SOD) and a increase in catalase (CAT) activity, reestablishing the reason SOD/CAT to levels of control animals (animals nondiabetic). We observed that the treatment with *Morus nigra* pulp and leaf extract decreased the carbonyl protein. In relation to metalloproteinase, there wasn't difference significantly in matrix metalloproteinase type 9 (MPP-9) activity, but there was a decrease in expression and activity of MPP-2 in diabetics

Araujo, C.M.

rats treated with *Morus nigra* extract. These results indicate that *Morus nigra* extract is more efficient in glycemic control and in modulation of MPP-2 than pulp of *Morus nigra* when applied in an experimental model type 1 diabetes.

Keywords: *Morus nigra*, Diabetes, Oxidative Stress, Matrix Metalloproteinase, Antioxidant Enzymes, Rats.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é um problema de importância crescente em saúde pública, pois sua incidência e prevalência estão aumentando e alcançando proporções epidêmicas. Este aumento se deve ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização e à crescente prevalência da obesidade e sedentarismo (SDB, 2013; WILD *et al.*, 2004).

A investigação clínica é a chave para proposta de novos medicamentos e tratamentos dispoconcentrações para pessoas que deles necessitam. Não seria possível tratar com sucesso o diabetes como atualmente ele é tratado sem os muitos trabalhos experimentais importantes que aconteceram ao longo dos últimos 85 anos. De fato, uma das maiores descobertas da história médica envolveu um trabalho de pesquisa testando o hormônio insulina (BANTING, *et al.*, 1922).

Desde então, novas atividades de investigação e desenvolvimento da insulina humana e de outros fármacos conduziram a melhores tratamentos e à maior sobrevida (MURRAY, *et al.*, 1994). Frente as novas perspectivas, torna-se imprescindível a procura de um tratamento capaz de contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos portadores de diabetes.

Antioxidantes que podem mitigar os efeitos danosos das espécies reativas tem sido o foco de pesquisas recentes (RAO & RAO, 2007). O efeito protetor de alguns tipos de alimentos é atribuído à presença de compostos fitoquímicos como carotenoide, tocoferóis e polifenóis, os quais possuem propriedades antioxidantes. Os flavonoides (do latim flavus, "amarelo") constituem o grupo mais abundante dentro dos compostos fenólicos, com mais de 6.500 compostos identificados (HENDRICH, 2006). Com base nestes estudos, produtos alimentícios e suplementos dietéticos com significativa potencial antioxidante têm sido o foco de intensas pesquisas (D'ANGELO *et al.*, 2009).

Neste trabalho, escolhemos a amora (*Morus nigra*) como possível substância antioxidante para o tratamento dos animais diabéticos, pois segundo VOLPATO *et al.*, 2011 e ARFAN *et al.*, 2012 ela apresenta alto poder antioxidante, além de ser de fácil acesso e baixo custo para a população (VOLPATO *et al.*, 2011). Neste sentido, um dos nossos objetivos foi avaliar as propriedades da polpa dos frutos e extrato das folhas da amoreira sobre a atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros bioquímicos em um modelo experimental de diabetes induzido por aloxano.

A amora é um alimento tradicional comestível, popularmente usado para tratar doenças hepáticas. OU *et al.*, em 2011, mostraram que o extrato de *Morus alba L.* reduziu significativamente o acúmulo de lipídeos, suprimiu a síntese e estimulou a oxidação dos ácidos graxos, sugerindo também que os efeitos hipolipidêmicos do extrato de amoreira poderiam ser efetivos na prevenção de gordura hepática. Esses indícios também nos levaram a verificar se haveriam mudanças no perfil lipídico em animais diabéticos tratados com *Morus nigra*. Outra meta de nosso estudo foi avaliar o efeito da polpa da amora e do extrato das folhas sobre a função hepática e renal destes animais, uma vez que existem estudos contraditórios na literatura a respeito do gênero *Morus*. DEEPA *et al.*, 2013 demonstrou que o extrato de *Morus alba* é capaz de induzir citotoxicidade em células de câncer do cólon humano e de células do câncer de mama, o que resultou em significativas alterações morfológicas das células e na fragmentação do DNA. Em contrapartida CHICHIOCO-HERNANDEZ *et al.*, em 2011, mostrou que extrato produzido a partir de folhas de *Morus alba* não eram citotóxicas.

Finalmente, tivemos também o interesse de avaliar o efeito da polpa da amora e do extrato das folhas sobre a atividade e expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) no tecido hepático desses animais. MMP são uma família de proteinases cálcio e zinco dependente, responsável pelo remodelamento da matriz extracelular, (PENGBO *et al.*, 2015), tendo ações biológicas sobre a expansão do tecido adiposo (HALBERG *et al.*, 2008), inflamação (MANICONE & MCGUIRE, 2008) e a resistência à insulina (ZHOU *et al.*, 2005). Estudos anteriores indicam que as MMP-2 e MMP-9 encontram-se alteradas na obesidade, no diabetes, dislipidemia e ainda na síndrome metabólica (HOPPS & CAIMI 2012). Sabe-se que no diabetes tipo 1, a hiperglicemia, a inflamação e a disfunção endotelial estão associadas com altas concentrações plasmáticas e teciduais de MMP e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (KADOGLOU *et al.*, 2005, GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009, GIEBEL *et al.*, 2005, PEETERS *et al.*, 2015), e por isto seria de grande interesse avaliar um possível efeito modulatório da polpa e do extrato das folhas de amoreira sobre a atividade destas metaloproteinases.

Baseado no que foi exposto acima, vale ressaltar que a amoreira é amplamente utilizada na cultura popular para diversas enfermidades, inclusive no tratamento do diabetes. Entretanto, ainda não existe comprovação científica para o uso da mesma. Neste sentido, este é o primeiro trabalho a conduzir um estudo comparativo entre a polpa e o extrato das folhas de amoreira no que diz respeito à sua caracterização fitoquímica, análise de parâmetros

Araujo, C.M.

bioquímicos e marcadores do estado redox em ratas diabéticas tipo 1, sendo um primeiro indício científico para subsidiar estudos posteriores (estudos clínicos) que tenham como objetivo validar ou refutar o uso popular desta planta no diabetes.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – DIABETES E SAÚDE PÚBLICA

O DM é considerado um problema de saúde pública mundial (SBD 2013; WILD *et al.*, 2004), sendo uma síndrome causada por distúrbios metabólicos, decorrentes de problemas na ação e/ou secreção da insulina, caracterizada por uma hiperglicemia crônica (SBD, 2009). Clinicamente, o DM é caracterizado pela poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, hiperglicemia, glicosúria, cetose, acidose e, em casos mais graves, o coma. (DIAS *et al.*, 2004)

Estima-se que existam mais de 387 milhões de pessoas com diabetes no mundo, sendo que projeções da Federação Internacional de Diabetes (IDF) para 2035 sugerem que esse número possa chegar a 592 milhões. Na América Latina quase 25 milhões de pessoas têm diabetes e esse número tende a crescer para 38 milhões em 2035. Estima-se que 1 a cada 12 adultos tem diabetes, 27% ainda não foram diagnosticados e representam o maior risco de desenvolvimento de complicações decorrentes do diabetes. O IDF prevê que o DM será a causa do óbito de 219 mil pessoas em 2024 e 45% desses óbitos serão com pessoas abaixo de 60 anos. (IDF, 2015)

No topo da lista dos países com maior número de diabéticos, nas estimativas realizadas para os anos de 1995 e 2000, estavam Índia, China e Estados Unidos, e estes permanecem nesse topo nas estimativas para 2030. O Brasil apareceu em oitavo lugar nas listas de 1995 e 2000, mas ocupará a sexta posição na estimativa para 2030, com aproximadamente 11,3 milhões de doentes (WILD *et al.*, 2004, KING *et al.*, 1998; SBD 2009). Em 2014, a população de diabéticos no Brasil era de 11,6 milhões, ou 8,7% da população adulta entre 20 e 79 anos (IDF, 2015). O DM é um problema de saúde considerado Condição Sensível à Atenção Primária, ou seja, evidências demonstram que o bom manejo deste problema ainda na Atenção Básica evita hospitalizações e mortes por complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (ALFRADIQUE *et al.*, 2009).

Embora se reconheçam os avanços conseguidos, lamentavelmente o DM ainda é, atualmente, uma das principais causas de incapacitação física para o trabalho, tornando o seu portador 25 vezes mais propenso à cegueira, 17 vezes mais susceptível à nefropatia, com

chances cinco vezes maiores de uma amputação de membros e o dobro de risco de uma doença cardiovascular (IDF, 2011).

O tratamento do DM gera custos onerosos para o sistema público de saúde, mas os prejuízos físicos e sociais causados ao indivíduo diabético e sua família não devem ser desconsiderados. As complicações geradas pelo diabetes muitas vezes impossibilitam o trabalho e atividades corriqueiras ao portador desta doença (SBD, 2009). Nas últimas duas décadas ocorreu um explosivo aumento no número de pessoas diagnosticadas no mundo. Enormes mudanças no ambiente, envelhecimento da população, urbanização, comportamento e estilo de vida dos seres humanos, que acompanham a globalização, têm resultado em obesidade e diabetes (SHAW *et al.*, 2010).

2.2 – CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES

A classificação atual para o DM segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (SBD, 2013) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) (ADA, 2014) é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. Portanto inclui quatro classes clínicas:

- 1- DM tipo 1 (auto-imune Tipo 1A e idiopática Tipo 1B);
- 2- DM tipo 2;
- 3- Outros tipos específicos de DM (defeitos genéticos na função da célula beta ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, induzidos por drogas e infecções);
- 4- DM gestacional.

No DM tipo 1 ocorre destruição das células β -pancreáticas, usualmente por processo auto-imune (forma auto-imune; tipo 1A) ou, menos comumente, de causa desconhecida (forma idiopática; tipo 1B). O DM tipo 1 é uma doença que afeta principalmente pacientes jovens, constituindo cerca de 10% do total de diabéticos (GROSS *et al.*, 2002). O início dos sintomas e sinais é abrupto, ocorrendo na infância ou puberdade. É o tipo mais agressivo, apresentando complicações mais severas como hiperglicemia intensa e cetoacidose. Resulta em aumento na susceptibilidade a infecções, neuropatia, retinopatia, nefropatia, aterosclerose acelerada associada ao infarto do miocárdio e amputações (ADA, 2014, VERNILLO, 2001). Sua etiologia está relacionada com a destruição autoimune de aproximadamente 80% das células beta das ilhotas pancreáticas. Desta forma, as células beta são destruídas quando

indivíduos com suposta predisposição genética são submetidos a eventos específicos como infecções virais, induzindo a respostas imunopatológicas (ADA, 2014).

Por outro lado, o DM tipo 2 acomete 90 a 95% das pessoas portadoras do diabetes, compreende indivíduos que têm uma resistência à insulina e usualmente podem acometer uma relativa, mas não absoluta deficiência de insulina (ADA, 2014; SHAW *et al.*, 2000). É caracterizado por dois principais defeitos metabólicos: 1) distúrbio na secreção de insulina, que, com o passar do tempo, diminui em relação à demanda de glicose e, 2) resistência insulínica, resultante da incapacidade dos tecidos periféricos em responder à insulina. (COTRAN *et al.*, 2000). Os principais fatores de risco envolvidos neste tipo de diabetes são a obesidade, a dieta hipercalórica e os hábitos sedentários (BLOOMGARDEN, 2006). Nesse sentido, o diagnóstico ocorre em pacientes com aproximadamente 40 anos exibindo redução do metabolismo e aumento do peso.

2.3 – ALTERAÇÕES METABÓLICAS E COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS

O diabetes é uma síndrome marcada por inúmeras complicações que podem ser agudas ou crônicas, sendo que estas últimas são mais frequentes devido ao aumento da expectativa de vida dos indivíduos diabéticos (DÍAZ-FLORES *et al.*, 2004). Muitos estudos sugerem que essas complicações são originadas a partir das alterações metabólicas decorrentes da doença, especialmente da hiperglicemia (GROSS & NEHME, 1999).

Pesquisas tem demonstrado que a hiperglicemia crônica pode modificar o curso natural do diabetes uma vez que ela contribui consideravelmente para a alteração e/ou perda de função das células β -pancreáticas promovendo, assim, uma contínua deterioração do controle metabólico do organismo (CERNEA & DOBREANU, 2013). Esse fenômeno é denominado glicotoxicidade e tem como consequências principais a diminuição da tolerância à glicose e a redução do número de células β -pancreáticas.

Em condições fisiológicas, as células β -pancreáticas são extremamente sensíveis às mudanças glicêmicas e, até certo ponto, possuem a capacidade de se adaptar e responder a essas variações. Entretanto, em condições de hiperglicemia crônica este balanço é alterado e essas células passam a sofrer os efeitos deletérios da elevada concentração de glicose.

Atualmente, estudos têm sugerido que o aumento nas dislipidemias em indivíduos diabéticos seja um processo decorrente da hiperglicemia crônica e que ele pode agravar ainda mais o estado de saúde desses pacientes (ROBERTSON *et al.*, 2003). Nesse sentido, um

Araujo, C.M.

estudo experimental com ratos diabéticos verificou que o aumento do processo aterosclerótico nesses animais foi normalizado após tratamento insulínico intensivo. Esse resultado deixa evidente o fundamental papel do ambiente diabetogênico no surgimento de doenças secundárias aos distúrbios no metabolismo de lipídios que ocorrem nessa doença (RENARD *et al.*, 2004).

O DM está frequentemente associado à hiperlipidemia. No caso do tipo 2 atribui-se à obesidade grande responsabilidade sobre o surgimento desses distúrbios lipídicos; quadro que pode ser agravado com o desenvolvimento da doença. Já no diabetes tipo 1, a hiperlipidemia desenvolve-se concomitantemente com a deficiência de insulina. A deficiência deste hormônio no DM tipo 1 provoca alterações no metabolismo lipídico fazendo com que a lipogênese esteja inibida e a lipólise estimulada no tecido adiposo. O resultado desse processo é um significativo aumento na concentração de ácidos graxos plasmáticos e de triacilgliceróis no fígado (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

Várias pesquisas têm sido realizadas no sentido de se avaliar quais são os efeitos do aumento de ácidos graxos plasmáticos sobre a função das ilhotas pancreáticas e conseqüentemente sobre o desenvolvimento do diabetes. Em condições fisiológicas, os ácidos graxos podem ser utilizados como combustíveis pelas células β -pancreáticas. No entanto, evidências científicas mostram que quando essas células são expostas de forma crônica a elevadas concentrações desses compostos lipídicos, eles podem desencadear efeitos tóxicos sobre as células β -pancreáticas (MCGARRY & DOBBINS, 1999). Esse processo é chamado de lipotoxicidade.

Os mecanismos desencadeados pela lipotoxicidade em células β -pancreáticas ainda não foram totalmente elucidados. Contudo, algumas inferências baseadas em estudos experimentais têm sido realizadas. Uma delas sugere que os efeitos deletérios dos ácidos graxos são mediados pelos metabólitos lipídicos que se acumulam no citosol dessas células. Segundo esse mecanismo, em condições de normoglicemia, o excesso de ácido graxo é facilmente eliminado por meio da β -oxidação na mitocôndria. Entretanto, na presença de elevadas concentrações de glicose esses metabólitos se acumulam no citosol causando danos às células. Um estudo *in vitro* foi realizado submetendo-se ilhotas pancreáticas isoladas de ratos à exposição com palmitato e chegou-se a conclusão de que esse metabólito só foi capaz de inibir o gene que expressa a insulina na presença da hiperglicemia (ROBERTSON *et al.*, 2004). Esse resultado sugere um possível sinergismo entre as ações das elevadas concentrações de glicose e também de ácidos graxos em causar danos às células β -

Araujo, C.M.

pancreáticas e outros órgãos. Esse processo pode ser fundamental na etiologia e progressão do diabetes tipos 1 e 2 (PRENTKI *et al.*, 2002).

Com base em todo o contexto explicitado anteriormente, um controle glicêmico rigoroso é de extrema importância para que os pacientes possam evitar as complicações do diabetes e conviver com a doença (SALES, 2011).

O tratamento farmacológico do diabetes visando redução da glicemia exhibe efeitos positivos, no entanto, devido às reações adversas e ao seu elevado custo, muitas pesquisas têm sido realizadas no sentido de descobrir novas formas de terapia. Fundamentados nesse interesse, muitos estudos têm investigado os potenciais efeitos antidiabetogênicos de substâncias químicas presentes em algumas plantas medicinais na busca de terapias alternativas para o diabetes (DORNAS *et al.*, 2009).

2.4 – DIABETES, ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

Sabe-se que o DM (tipos 1 e 2) é acompanhado por aumento da formação de espécies reativas e diminuição da capacidade antioxidante, conduzindo a danos oxidativos nos componentes celulares (BASHAN *et al.*, 2009), sugerindo que o estresse oxidativo tenha um papel central na patogênese das complicações do diabetes (BROWNLEE *et al.*, 2001; BASHAN *et al.*, 2009), sendo este desencadeado, na maioria das vezes, pela hiperglicemia.

Uma das consequências da hiperglicemia é a auto-oxidação da glicose, através da enolização desta molécula, gerando um radical enediol. Este radical enediol transfere seu elétron não pareado a uma molécula de O₂, gerando um ânion superóxido e uma dicarbonila. A dicarbonila liga duas cadeias protéicas formando uma ligação cruzada entre elas e inativando-as (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2003).

A enolização da molécula de glicose tem como consequência o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que pode levar a uma peroxidação lipídica, que consiste da ligação destas espécies a uma ligação insaturada de um ácido graxo, modificando a sua estrutura e, quando submetido ao calor ou hidrólise, leva à formação de malonaldeído e a outros produtos finais.

Sendo assim, vários mecanismos parecem estar envolvidos no desenvolvimento do estresse oxidativo induzindo pela hiperglicemia, como auto-oxidação da glicose, glicação de proteínas, formação de produtos de glicação avançada (AGEs) e a via do poliol (BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2000).

Neste contexto, sabe-se que EROs são uma família de moléculas altamente reativas que incluem o oxigênio molecular e seus derivados produzidos em todas as células aeróbicas (BYUN, 2009). Muitas espécies reativas de oxigênio possuem elétrons desemparelhados sendo então derivados radicalares. Estas espécies incluem moléculas como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (HO), óxido nítrico (NO), e os radicais lipídicos. Outras espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), e ácido hipocloroso (HOCl) são derivados não radicalares, mas possuem efeitos oxidantes que contribuem para o estresse oxidativo (CAI & HARRISON, 2000; BYUN, 2009).

A produção celular de uma espécie reativa de oxigênio pode levar à produção de muitas reações em cadeia. Por exemplo, as reações entre radicais livres e ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular podem resultar em um radical peroxila de ácido graxo (R-COO), que pode atacar cadeias laterais de ácidos graxos adjacentes e iniciar a produção de outros radicais lipídicos. Radicais lipídicos produzidos nesta reação em cadeia se acumulam na membrana celular e podem ter uma miríade de efeitos sobre as funções celulares. Além disso, os produtos finais da peroxidação lipídica, inclusive aldeídos insaturados e outros metabólitos, têm propriedades citotóxicas e mutagênicas (CAI e HARRISON, 2000).

Células e tecidos contêm mecanismos de defesas antioxidantes que previnem a produção de espécies reativas e mantêm o balanço redox da célula ou tecido (RAINS & JAIN, 2011). Antioxidantes são definidos como componentes que podem doar pelo menos um átomo de hidrogênio a um radical livre, agindo de forma preventiva contra a formação de espécies reativas, ou interceptando as reações através da inativação das espécies reativas que estejam em atividade. Os antioxidantes de forma geral podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (VINCENT, 2004; SIES, 1993).

Defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx), a glutatona redutase (GR) e a catalase (CAT). Antioxidantes não-enzimáticos são representados por ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenoide, flavonoides e outros antioxidantes, os quais são capazes de neutralizar EROs (BOUDERBALA *et al.*, 2010 e LEE *et al.*, 2009).

Dentre as principais enzimas antioxidantes, destacam-se a SOD, CAT e GPx (figura 1). A enzima SOD é capaz de converter o ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nos sistemas eucariontes existem três formas de SOD. A forma SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD) está presente principalmente no citoplasma e nos fluidos extracelulares, a SOD-manganês (Mn-SOD) está localizada principalmente nas mitocôndrias, enquanto que a SOD

Araujo, C.M.

extracelular é exclusiva dos fluidos extracelulares. Esta enzima tem papel fundamental na defesa do organismo contra o ataque de EROs, pois atua através da dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (MARKLUND *et al.*, 1982). O H₂O₂ formado pela SOD é rapidamente difundido através da membrana mitocondrial e transformado em água por enzimas antioxidantes como CAT e GPx (NAUDI *et al.*, 2011) (figura 2).

A catalase é uma hemoproteína que se localiza nos peroxissomos e catalisa a detoxificação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (AEBI, 1984). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (MAYES, 1990). Sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT *et al.*, 1991). A suplementação de catalase exógena previne a oxidação da glutatona mediada pelo H₂O₂, e inibe as lesões oxidativas do DNA submetido à sobrecarga de Fe⁺³ (ARUOMA *et al.*, 1989).

A glutatona peroxidase é uma enzima dependente de selênio que ao catalisar o peróxido de hidrogênio e outros peróxidos converte a glutatona reduzida para o seu estado oxidado. Por isso outra enzima fundamental é a glutatona redutase, que regenera a glutatona usada como doadora de hidrogênio pela GPx durante a eliminação do H₂O₂ (JOHANSEN *et al.*, 2005).

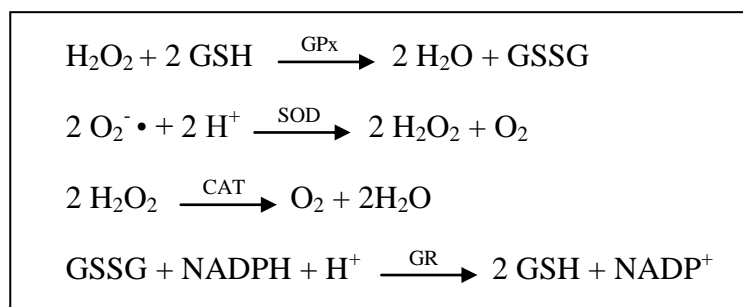


Figura 1: Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes (GPx – glutatona peroxidase; SOD – superóxido dismutase; CAT – catalase; GR – glutatona redutase; GSH e GSSG – formas reduzida e oxidada da glutatona, NADPH e NADP⁺ - formas reduzida e oxidada da nicotinamida adenina-dinucleotídeo fosfato)

As isoenzimas da GPx são tecido-específicas, codificadas por diferentes genes e apresentam especificidade para substratos distintos e incluem a GPx-1 ou clássica, GPx-2 específica do trato gastrointestinal, GPx-3 plasmática e GPx-4 também chamada de fosfolípido hidroperóxido glutatona peroxidase (HADDAD & HARB 2005). A GPx clássica

é uma das selenoproteínas mais abundantes e têm sido sugerido que o estresse oxidativo está relacionado à redução de sua expressão (CHENG *et al.*, 1999).

Considerando a importância da enzima glutatona peroxidase, vale resaltar que a glutatona (GSH, L- γ -glutamil-L-cistetilglicina) é um tripeptídeo contendo cisteína, sendo o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. O núcleo de resíduo cistetilglicina da GSH está envolvido na sua função como antioxidante, atuando como um redutor intracelular, capaz de reagir com um elétron não pareado de um radical livre, formando um radical GS• que produz por dimerização a glutatona oxidada (GSSG). A glutatona reduzida (GSH) atua de maneira importante na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo, podendo ser destacada três das suas principais funções: *i*) é usada como substrato pela glutatona peroxidase na eliminação de hidroperóxidos; *ii*) A GSH pode otimizar a capacidade antioxidante da vitamina E, mantendo-a na sua forma reduzida e funcional; *iii*) a GSH através da glutatona S-transferase é capaz de detoxificar aldeídos reativos gerados durante a peroxidação lipídica (JORDÃO *et al.*, 1998).

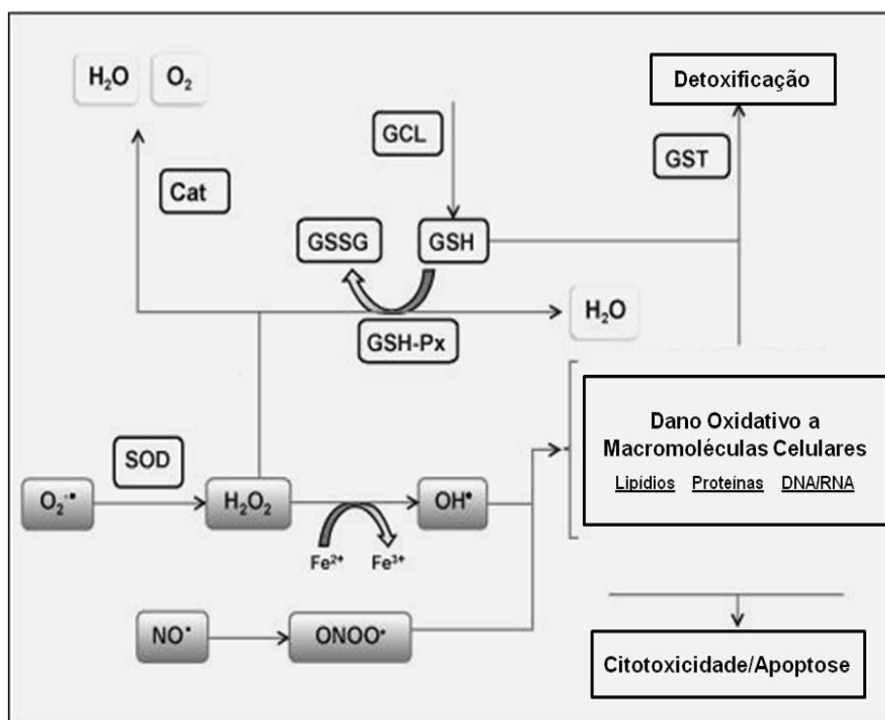


Figura 2: Mecanismos enzimáticos de defesas antioxidantes. O₂•⁻ radical superóxido, H₂O₂ peróxido de hidrogênio, OH• - radical hidroxila, NO• óxido nítrico, ONOO• peroxinitrito, SOD superóxido dismutase, Cat catalase, GSH glutatona reduzida, GSH-Px glutatona peroxidase, GSSG glutatona oxidada, GCL gama-glutamilcisteína sintase, GST glutatona S-transferase. Fonte: Adaptado de TANG e WANG (2012).

Sabe-se que a maioria dos antioxidantes enzimáticos, como SOD, GPx e catalase estão abundantemente expressos no fígado, sendo este o principal órgão envolvido em processos oxidativos e de detoxificação (STADLER *et al.*, 2003).

Além dos antioxidantes enzimáticos, diversos antioxidantes não enzimáticos têm alcançado papel relevante no tratamento e prevenção de doenças. Muitos deles estão presentes em frutas e fitoterápicos, de forma que uma dieta rica em micronutrientes e com grande variedade de frutas e hortaliças garante uma boa ingestão de antioxidantes (PERCIVAL, 1998). Os polifenóis presentes em plantas são uma importante classe de defesas antioxidantes. Esses compostos ocorrem geralmente em elevadas concentrações e são amplamente encontrados nas plantas medicinais ou utilizados na alimentação. Os polifenóis mais encontrados são os fenóis, ácidos fenólicos, taninos e flavonoides (PIETTA, 2000).

De acordo com HALLIWELL & GUTTERIDGE (2007), os flavonoides parecem agir como bons antioxidantes, pois são capazes de inibir a formação de EROs, eliminar as espécies reativas excedentes e, aumentar ou proteger as fontes de defesas antioxidantes. Muitos flavonoides podem ainda agir eficientemente quelando elementos traço, tais como ferro e cobre livres, que podem aumentar a formação de EROs através da redução do peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila ou pela oxidação do LDL mediada por cobre (PIETTA, 2000).

Por fim, de acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados também em duas categorias: sistema primário ou secundário. O sistema primário são os inibidores preventivos, ou seja, retardam a fase de iniciação impedindo a geração de espécies reativas ou sequestram essas espécies, impedindo sua interação com os alvos celulares. Os inibidores preventivos podem induzir a decomposição de hidroperóxidos para produtos inativos, como por exemplo, os tióis, sulfetos, catalase e as glutatonas peroxidase e S-transferase. O β -caroteno e a vitamina E também são considerados inibidores preventivos. O sistema secundário consiste nos bloqueadores da propagação da cadeia radicalar (*chain breaking*) que, efetivamente, removem radicais intermediários, como o radical alcóxila ou peróxila. Esses antioxidantes interrompem a sequência de auto-oxidação em cadeia, reagindo com os radicais livres para produzirem produtos estáveis. Uma terceira classe de antioxidantes a ser considerado seriam os sistemas de reparo do DNA, as proteases e as fosfolipases que removem as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídeos (JORDÃO *et al.*, 1998; SIES, 1993).

2.5 – METALOPROTEINASES DE MATRIZ

A matriz extracelular é um complexo estrutural que envolve e apoia as células encontradas nos tecidos. Ela é composta principalmente por proteínas estruturais (colágeno e elastina), proteínas especializadas ou moléculas adesivas (fibronectina, laminina e fibrilina), proteínas da matriz e moléculas de superfícies de células. (CAWSTON & WILSON, 2006). As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes responsáveis pela remodelamento e degradação da matriz extracelular da membrana basal (CAWSTON & WILSON, 2006) (PENGBO *et al.*, 2015). Elas apresentam várias ações biológicas sobre a expansão do tecido adiposo (HALBERG *et al.*, 2008), inflamação (MANICONE & MCGUIRE, 2008) e a resistência à insulina (ZHOU *et al.*, 2005). E estas endopeptidases são também reguladores importantes dos processos fisiológicos, como a angiogênese, a morfogênese, a reparação tecidual, tendo participação em algumas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, artrite, diabetes, entre outros (PAGE-McCAW *et al.*, 2007; GHAJAR *et al.*, 2008; GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009).

As MMP são produzidas por vários tipos de células (fibroblastos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células sinoviais e algumas epiteliais) (SPINALE, 2007), sendo secretadas em sua forma latente, como pró-enzimas ou zimogênios, e, por isso, requerem uma ativação proteolítica que ocorre após a remoção do pró-peptídeo. Esse processo é acompanhado pela quebra de ligação entre o grupo tiol da cisteína no pró-peptídeo e o zinco no domínio catalítico (GEURTS *et al.*, 2012; MANNELLO & MEDDA, 2012).

Desde a primeira descrição das MMP em 1962, foram identificadas 30 enzimas pertencentes a essa família de endopeptidases, classificadas em seis grupos de acordo com seu substrato específico e com a organização de seu domínio catalítico (SNOEK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005; KUPAI *et al.*, 2010; GEURTS *et al.*, 2012). As colagenases correspondem a MMP-1, MMP-8 e MMP-13 e são capazes de clivar principalmente o colágeno I, II e III do interstício. O grupo das gelatinases é composto por MMP-2 e MMP-9, que digerem a gelatina e desnaturam o colágeno IV. As matrilisinas, MMP-7 e MMP-26, digerem a fibronectina e gelatinas. As MMP de membrana são MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, que podem digerir várias proteínas da matriz extracelular (MEC), como gelatina, fibronectina e laminina. As estromelinas, MMP-3 e MMP-10, degradam principalmente a fibronectina, a laminina e a elastina. Embora a MMP-11 seja conhecida como uma estromelina, ela apresenta diferença na sequência de aminoácidos e no seu substrato específico quando comparada com a MMP-3 e MMP-10. Por

isso, a MMP-11 também pode ser incluída no sexto grupo, que abrange as endopeptidases remanescentes MMP-12, MMP-19, MMP- 20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28 e que ainda não foi definido completamente (SNOEK-VAN BEURDEN & VON DEN HOFF, 2005).

A atividade das MMP é regulada por fatores epigenéticos e genéticos, bem como de maneira pós-transcricional por citocinas, hormônios, fatores de crescimento e interações célula-célula e célula-matriz, podendo ser reguladas, também, por inibidores fisiológicos endógenos e estresse oxidativo (KUPAI *et al.*, 2010; GEURTS *et al.*, 2012).

Os principais inibidores endógenos das MMP são os Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) que, apesar da terminologia, são encontrados também no soro, assim como as MMP (NIKKOLA *et al.*, 2005; MIN *et al.*, 2012). Atualmente, são conhecidos quatro tipos de TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, com o tamanho aproximado de 23 kDa (SCHULZ, 2007). A ligação dos TIMPs com as MMP ocorre através da proporção molar estequiométrica 1:1 e, portanto, formam um importante sistema para o controle da atividade endógena das MMP *in vivo*. Ao se ligarem às MMP, os TIMPs bloqueiam o sítio ativo, impedindo o acesso ao substrato específico (SPINALE *et al.*, 2000). A detecção e a quantificação da atividade enzimática das MMP e dos TIMPs são fundamentais para compreensão da participação dessas endopeptidases tanto no aspecto fisiológico quanto patológico.

Estudos anteriores indicam que as MMP-2 e MMP-9, encontram-se alteradas na obesidade, no diabetes, dislipidemia e ainda na síndrome metabólica (HOPPS & CAIMI, 2012). As concentrações plasmáticas de MMP têm sido observados como sendo maiores em indivíduos com diabetes tipo 1, sendo importante ressaltar que, em condições fisiológicas, as concentrações das MMP nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis. (THRAILKILL *et al.*, 2007, GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009). Vale ressaltar que os mecanismos exatos que levam a danos vasculares no diabetes tipo 1 ainda não foram completamente estabelecidos (SNELL-BERGEON & NADEAU, 2012), mas é sabido que estes danos prejudicam a regulação da matriz extracelular e a mesma sofre remodelamento pela ação de MMP, contribuindo para o desenvolvimento de complicações vasculares (GALIS & KHATRI, 2002; KADOGLOU *et al.*, 2005). A associação entre MMP e doença macrovascular em pacientes com diabetes tipo 1 ainda não foram investigados, enquanto estudos sobre a associação entre concentrações de MMP e complicações microvasculares parecem contraditórios (JACQUEMINET *et al.*, 2006). Segundo relatos científicos foi

Araujo, C.M.

observado que no diabetes, a hiperglicemia, a inflamação e a disfunção endotelial estão associadas com altas concentrações plasmáticas e teciduais de MMP e TIMP (KADOGLOU *et al.*, 2005, GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009, GIEBEL *et al.*, 2005, PEETERS *et al.*, 2015).

A MMP-2 é conhecida como gelatinase A e a MMP-9 como gelatinase B, sendo que a MMP-2 é de expressão constitutiva, pouco responsiva à maioria de estímulos e a MMP-9 é induzível, sendo considerada um marcador da inflamação sistêmica em animais (OPDENAKKER *et al.*, 2001). Sendo assim, a detecção e a quantificação da atividade enzimática das MMP são fundamentais para compreensão da participação dessas endopeptidases tanto no aspecto fisiológico quanto patológico no diabetes.

2.6 – ANTIOXIDANTES DA DIETA E SUA IMPORTÂNCIA NO PADRÃO ALIMENTAR

Considerando que os mecanismos de defesa contra as EROs no organismo humano podem ser insuficientes e os danos causados podem se tornar cumulativos e resultar em estresse oxidativo debilitante, torna-se essencial acrescentar à dieta alimentos antioxidantes que ampliem a sua capacidade de inativar estas espécies instáveis (AMES, 1993). Entre os antioxidantes da dieta estão o ácido ascórbico, carotenoide, tocoferóis, compostos polifenólicos e flavonoides (MEYDANI, 1992).

Estudos epidemiológicos têm mostrado consistentemente que o consumo de frutas e hortaliças está associado com um menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas como doença coronária cardíaca, diabetes, câncer e Alzheimer (D'ANGELO *et al.*, 2009). Baseados nisto, orientações dietéticas foram formuladas ao redor do mundo para a redução de riscos e prevenção de doenças crônicas como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e osteoporose (RAO & RAO, 2007).

Frutas e hortaliças são boas fontes de fitoquímicos antioxidantes, os quais podem mitigar os efeitos danosos de EROs (RAO & RAO, 2007). Os antioxidantes naturais podem proteger o corpo humano dos radicais livres e retardar a oxidação de lipídios e a progressão de muitas doenças crônicas (LAI *et al.*, 2001). Eles podem agir diretamente na neutralização da ação das espécies reativas ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (SHAMI & MOREIRA, 2004).

Estudos mostram que, nos dias de hoje, uma infinidade de fármacos são usados para o controle do DM, contudo o controle glicêmico ideal geralmente não é alcançado (COOPPAN, 2005), por isto muitas plantas têm sido utilizadas para controlar e/ou tratar o DM (VOLPATO

Araujo, C.M.

et al., 2002; VOLPATO *et al.*, 2008). O uso de plantas medicinais como terapia alternativa é amplamente difundido nas populações dos países em desenvolvimento, que têm acesso limitado à assistência médica. Os efeitos de muitas destas plantas já são comprovados experimentalmente em animais e humanos, enquanto outros requerem pesquisas complementares (PRINCE *et al.*, 1998). Neste contexto, a amora tem sido amplamente utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento do diabetes (VOLPATO *et al.*, 2011).

A amora (*Morus nigra*) pode ser encontrada em muitos países e, praticamente todas as partes da árvore são utilizadas para ações farmacológicas no mundo (SINGAB *et al.*, 2005; PAWLOWSKA *et al.*, 2008). Devido à presença de elevada concentração de substâncias fenólicas, as amoras têm sido estudadas para avaliar suas atividades biológicas como, antioxidante, antiangiogênica, antibacteriana e antiviral, o que poderia levar à uma melhora na resposta imune, melhora no perfil lipídico, redução da agregação plaquetária e melhora do metabolismo hormonal (ZAFRA-STONE *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não há estudos na literatura que avaliem os efeitos dessa planta sobre o metabolismo do DM tipo 1. Sendo assim, este estudo teve como uma das metas analisar o efeito hipoglicemiante da polpa e do extrato das folhas de amora (*Morus nigra*) em ratas diabéticas tipo 1.

2.7 – AMORA (*MORUS NIGRA*)

As plantas do gênero *Morus* (figura 3) são também popularmente conhecidas por amoreira preta. Trata-se de árvores de porte médio que podem atingir cerca de 4 a 5 metros de altura, possuem casca ligeiramente rugosa, escura e copa grande. As folhas têm coloração mais ou menos verde, com uma leve pilosidade que as tornam ásperas. As flores são de tamanho reduzido e cor branco-amarelada. As amoreiras crescem bem em todas as regiões do Brasil e Portugal, apresentam crescimento rápido, adaptando-se a qualquer tipo de solo, preferindo os úmidos e profundos. Frutifica de setembro a novembro no Brasil, e de maio a agosto em Portugal. As amoras são frutos pendentes, de coloração vermelho-escura, quase preta, quando maduros, com polpa vermelho-escura comestível, a coloração de seus frutos varia de acordo com a espécie à qual pertencem e conforme o seu grau de maturação (EMBRAPA, 2014).



Figura 3: Foto da árvore (A) Fonte: <https://www.flickr.com/photos/hornbeam/4779454090> e frutos (B) de amora (*Morus nigra*) Fonte: <http://www.ebay.com.au/itm/Black-Mulberry-Morus-nigra-50-Seeds-/360624796857>.

Sabe-se que a amora contém substâncias químicas solúveis conhecidas como flavonoides. Estes antioxidantes poderosos podem ser responsáveis por suas propriedades medicinais (URSELL, 2000; GONZÁLEZ *et al.*, 2010). Pesquisas já demonstraram que extratos obtidos a partir dos frutos de *Morus nigra* exibem potencial antioxidante quando comparados ao antioxidante de referência trolox. Segundo ARFAN *et al.*, (2012) o extrato fluido livre de açúcar (EFLA) da *Morus nigra* possui maiores teores de compostos fenólicos totais: 164 mg/g (metanólico SFE) e 173 mg/g (acetônico SFE) e também ácidos fenólicos, flavonoides, ácido clorogênico e rutina quando comparados ao EFLA da *Morus alba* (amora branca) (ARFAN *et al.*, 2012).

Os frutos da amoreira são usados para tratar inflamação e estancar sangramento, a casca para cessar dor de dente, as folhas para picadas de cobra como um antídoto para o envenenamento (SINGAB *et al.*, 2005; PAWLOWSKA *et al.*, 2008). Na Europa, as folhas da amoreira têm sido utilizadas para estimular a produção de insulina no tratamento de diabetes (ODY MNIMH, 2000; NADERI *et al.*, 2004). O efeito hipoglicemiante das folhas de amoreira preta é semelhante à atividade do antidiabético glibenclamida utilizado no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 (ANDALLU *et al.*, 2001). Estudos experimentais têm demonstrado também o efeito hipoglicemiante do extrato de amora (HOSSEINZADEH & SADEGHI, 1999; MICHINORI *et al.*, 2001; PETLEVSKI *et al.*, 2001).

Entretanto VOLPATO *et al.*, (2005) relatou que o extrato de *Morus nigra* não apresenta efeito hipoglicemiante em ratas diabéticas e não-diabéticas grávidas. Porém, o tratamento com a amora teve efeito antioxidante, contribuindo para reduzir a incidência de

Araujo, C.M.

anomalias internas nas proles de ratas diabéticas. Além disso, existem estudos relatando que as folhas de *Morus nigra* possuem propriedades antioxidantes (KATSUBE *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2013), anticarcinogênica (Dat *et al.*, 2010; Skupien *et al.*, 2008), hipoglicêmica (CHUNG *et al.*, 2013), antiobesidade (OH *et al.*, 2009 ; TSUDUKI *et al.*, 2013), antimicrobiana (OMIDIRAN *et al.*, 2012) e vasodilatadora (XIA *et al.*, 2008)

No Brasil, as plantas pertencentes ao gênero *Morus* estão listadas pelo governo como extremamente interessantes para a pesquisa por serem amplamente usadas na medicina popular e pelo seu potencial fitoterápico (PORTAL DA SAÚDE, 2013). Sendo assim a validação científica da amora é um passo necessário, impulsionada pelo uso popular já existente e bastante difundido desta planta, como ilustrado na figura 4 a comercialização das folhas de amora seca para diversos fins, como diurético, anti-hipertensivo e antidiabético.



Figura 4: Foto da folha de amora (*Morus nigra*) em um pequeno comércio em Monte Verde-MG. Fotografia: Daniela C. C. Calsavara.

Sendo assim, baseado nas informações dispoconcentrações até o momento sobre a *Morus nigra*, o objetivo geral deste estudo foi avaliar a eficácia da polpa e do extrato das folhas de amora sobre a modulação de parâmetros bioquímicos e a atividade de enzimas

Araujo, C.M.

antioxidantes, uma vez que se sabe que a modulação do estresse oxidativo pode ser um fator importante para minimizar as complicações decorrentes do diabetes.

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia da polpa e do extrato das folhas de amora (*Morus nigra*) sobre a modulação dos marcadores metabólicos e marcadores do estado redox celular em um modelo de diabetes tipo 1 experimental em ratas.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO ESPECÍFICO 1 (ENSAIOS *IN VITRO*)

Caracterizar a polpa e extrato das folhas de amoreira em relação a sua:

- À composição fitoquímica;
- À concentração de polifenóis totais;
- À capacidade antioxidante em sequestrar o radical DPPH•

OBJETIVO ESPECÍFICO 2 (ENSAIOS *IN VIVO*)

I - Em soro/plasma de animais não diabéticos, diabéticos, diabéticos tratados com polpa e diabéticostratados com extrato das folhas avaliar:

1. A glicemia e a insulinemia
2. O perfil lipídico;
3. A função renal;
4. A função hepática;

II - Em fígado de animais não diabéticos e diabéticos avaliar:

1. A atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona peroxidase (GPx) e Glutaciona redutase (GR);
2. Concentração de glutaciona total e a relação GSH/GSSG;
3. As concentrações de proteína carbonilada;
4. A expressão e atividade de MMP;
5. Análise histológica.

CAPÍTULO 4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – MATERIAL BOTÂNICO

Exemplares da amoreira-preta foram coletados em 2012 no município de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A excisada da planta foi preparada e identificada pela Doutora Viviane R. Scalon, e posteriormente (identificação OUPR 27087) depositada no herbário José Badini da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Verificou-se que o exemplar coletado pertencia ao gênero *Morus* e a espécie tratava-se de *Morus nigra*.

4.1.1 – OBTENÇÃO DA POLPA AMORA

Para a obtenção da polpa de amora, os frutos foram colhidos, imediatamente higienizados com água corrente e submetidos à extração, sendo prensados e em seguida com o auxílio de uma gaze limpa foi realizada uma filtração para a retenção da parte sólida (sementes e fibras). A polpa concentrada obtida, de coloração vinho e cheiro adocicado, não foi diluída para o ensaio *in vivo*. A polpa foi armazenada em freezer -80°C em alíquotas de 15mL.

4.1.2 – OBTENÇÃO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE AMOREIRA

Para a obtenção do extrato das folhas de amora, as folhas trituradas foram submetidas à extração com água destilada e álcool etílico na proporção de 1:1 durante 24 horas em percolador. Em seguida foi realizada a filtração a vácuo e os extratos obtidos foram concentrados em rotavaporador. Todos os processos foram realizados ao abrigo da luz. O preparo do extrato hidroetanólico foi baseado no método descrito por GRANCE et al. 2008, HOSSEINZADEHH *et al.*, 1999 e ALMEIDA *et al.*, 2012. O extrato das folhas concentrado obtido, de coloração verde escura e cheiro adocicado, foi dissolvido em água filtrada, tendo a concentração final de 150 mg/mL (NOGUEIRA *et al.*, 2011), sendo armazenados em freezer -80°C em alíquotas de 15mL.

4.2 – ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

Este ensaio teve como objetivo quantificar polifenóis totais em amostras de extratos vegetais. Neste método o reagente Folin-Ciocalteu se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, produzindo óxidos de tungstênio (W_2O) e molibdeno (Mo_8O_{23}) de cor azul que absorvem no comprimento de onda de 720 nm (GEORGÉ *et al.*, 2005).

4.2.1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO

Primeiramente foi preparada uma solução estoque do padrão ácido gálico a 500 mg/L em água destilada. Foram realizadas sucessivas diluições a partir dessa solução para a obtenção de soluções com as seguintes concentrações: 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 30 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$. Em tubos de ensaio, foram colocados 0,5mL de cada solução (nas diferentes concentrações) com 2,5mL da solução de Folin-Ciocalteu. O branco foi preparado adicionando-se 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso 2 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio a 75 g/L. As misturas foram homogeneizadas e deixadas em repouso durante 15 minutos em banho-maria à 50°C. Após esse tempo de incubação, as misturas foram rapidamente resfriadas em banho de gelo e as absorbâncias foram determinadas a 760 nm.

4.2.2 – DILUIÇÃO E LEITURA DAS ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS

A polpa e o extrato das folhas amora foram diluídos 200 vezes em água destilada. Em seguida foram colocados em tubos de ensaio, 0,5 mL das diluições de cada tratamento (polpa da fruta e extrato das folhas) aos quais foram adicionados 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu. Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso 2 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação, adicionou-se 2mL de solução de carbonato de sódio a 75g/L. As misturas foram homogeneizadas e deixadas em repouso durante 15 minutos em banho-maria à 50°C. Após esse tempo de incubação, as misturas foram rapidamente resfriadas em banho de gelo e as absorbâncias foram determinadas a 760nm.

4.2.3 – EXPRESSÃO DOS RESULTADOS DO ENSAIO DE POLIFENÓIS TOTAIS

Para calcular a concentração de polifenóis totais nos extratos, primeiramente o valor da absorbância do branco foi subtraído dos valores de absorbância obtidos para o padrão e para as amostras. Em seguida, um gráfico foi construído a partir dos valores de absorbância por concentração de ácido gálico (mg/L). Através da equação da reta obtida no gráfico da curva padrão de ácido gálico, fez-se a interpolação dos valores de absorbância obtidos para as amostras. Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 g de extrato vegetal).

4.3 – CAPACIDADE ANTIXODANTE *IN VITRO* CONTRA O RADICAL DPPH

Um dos métodos mais utilizados para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Este método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o radical DPPH em solução de metanol. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

A atividade da polpa e do extrato das folhas de amora em sequestrar o radical DPPH foi medida de acordo com o procedimento descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995 e SOUSA *et al.*, 2007, com as devidas adequações. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX

A curva padrão foi realizada com o antioxidante de referência Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromo-2-ácido carboxílico). Primeiramente foi preparada uma solução estoque de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromo-2-ácido carboxílico) a 1000µM em metanol a 80%. Foram realizadas sucessivas diluições a partir dessa solução, obtendo soluções com as seguintes concentrações: 100 µmol/L, 200 µmol/L, 300 µmol/L, 400 µmol/L, 500 µmol/L, 600 µmol/L e 700 µmol/L. Em tubos de ensaio, foram colocados 0,1 mL de cada solução (nas diferentes concentrações) com 3,9 mL da solução de DPPH a 60 µM. A amostra controle foi feita com 0,1 mL de água destilada e 3,9 mL de solução de DPPH a 60 µM. Os tubos foram homogeneizados e armazenados no escuro por 30 minutos à temperatura

ambiente. Após esse tempo de incubação, a leitura das absorvâncias foram feitas no espectrofotômetro a 515 nm, calibrado com metanol 80% (“branco”).

4.3.2 – DILUIÇÃO E LEITURA DAS ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS

A polpa e o extrato das folhas de amora foram diluídos 50x, 100x e 200x em água destilada. Em seguida foram colocados em tubos de ensaio 0,1 mL das diluições de cada tratamento (polpa da fruta e extrato das folhas) aos quais foram adicionados 3,9 mL da solução do radical DPPH a 60 µM dissolvido em metanol a 80%. Os tubos foram homogeneizados e armazenados no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação, as absorvâncias foram determinadas no espectrofotômetro a 515 nm.

A atividade de sequestro do radical DPPH• foi avaliada pela diminuição da absorvância do DPPH e a porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Atividade Antioxidante} = \left[\frac{A \text{ controle (515nm)} - A \text{ amostra (515nm)} \times 100}{A \text{ Controle (516nm)}} \right]$$

Onde:

A controle (515nm) é a absorvância da solução da amostra controle e *A amostra (515 nm)* é a absorvância final da mistura reacional com a amostra ou antioxidante de referência.

4.4 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ANÁLISE DE CLAE-EM

A polpa e o extrato das folhas de *Morus nigra* foram submetidos a tratamento em cartuchos de extração em fase sólida (EFS) antes de serem analisados em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). O cartucho de EFS (3,0 mL), empacotado com fase estacionária C-18, foi ambientado com 2x4 mL MeOH/H₂O (9:1). Após esse procedimento, foram aplicados 20 mg da amostra e eluídas com 4,0 mL de MeOH/H₂O (9:1). Esse eluído foi seco e em seguida resuspendido e depois filtrado em filtros de difluoreto de polivinilideno 0,22 µm (Chromafil® PDVF) com volume suficiente para obter concentração de 2 mg/mL da amostra. Para a análise em CLAE-DAD-EM foram injetados 20,0 µL da amostra. As análises foram realizadas em equipamento Waters Acquity com detectores de DAD e EM utilizando coluna 1,7 mm x 50 mm x 3 mm d.i.

Araujo, C.M.

(CHS130 100 RP-18). A fase móvel utilizada foi água (A) e acetonitrila (B) ambos com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas com gradiente linear de 5 a 95% de B em 11 minutos. Os parâmetros de EM foram otimizados para obtenção da melhores resultados de ionização e ficaram definidos como temperatura capilar 320°C; voltagem do capilar 3,5 kV; tensão no capilar de 3 e -47V (para modos positivo e negativo, respectivamente); como gás de nebulização foi utilizado nitrogênio. A faixa de massa analisada foi de 100 a 1500 m/z para o modo positivo e negativo.

4.5 – EXPERIMENTOS *IN VIVO*

4.5.1 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Fisher, com idade aproximada de 120 dias e peso médio de 200 g, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental (Labnex), da Escola de Nutrição – ENUT, da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com temperatura, luminosidade e umidade controladas e receberam água e comida “*ad libitum*”.

Todos os procedimentos experimentais adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob protocolo nº 2012/19. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

Trinta e duas ratas foram distribuídas em 4 grupos de oito animais cada:

Grupo 1 – controle (C): os animais receberam 1mL de água filtrada por gavagem;

Grupo 2 – grupo diabético (D): os animais receberam 1mL de água filtrada por gavagem;

Grupo 3 – grupo diabético polpa (DP): os animais receberam 1mL de polpa de amora por gavagem;

Grupo 4 – grupo diabético folha (DF): os animais receberam 1mL do extrato das folhas de amora por gavagem;

4.5.2 – INDUÇÃO DO DIABETES EXPERIMENTAL COM ALOXANO

O diabetes foi induzido nos animais dos grupos D, DP e DF através de injeção intraperitoneal de uma dose única de Aloxano (Alloxan Monohydrate Sigma®) a 135 mg/Kg de peso, diluído em solução de NaCl a 0,9%. No grupo de ratas não diabéticas (grupo controle) foi administrada injeção intraperitoneal contendo o mesmo volume de solução de NaCl a 0,9%.

Posteriormente à aplicação da droga, foi fornecida aos animais uma solução de glicose 10%, como única fonte hídrica por 5 horas para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células beta do pâncreas (MAZZANTI *et al.*, 2003).

Para confirmação do diabetes, três dias após a indução com aloxano os animais foram submetidos à avaliação da glicemia após 8 horas de jejum. A determinação das concentrações de glicose foi feita retirando-se sangue da veia caudal e utilizando o glicosímetro Accu-Chek® Active da Roche (Boehringer Mannheim, IN, USA). Os animais com glicemia de jejum superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos e selecionados para o experimento.

4.5.3 – EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Ao fim do experimento, após 30 dias de tratamento os animais foram deixados em jejum por 8 horas e anestesiados por inalação com isoflurano. O sangue foi coletado através da veia localizada no plexo braquial até sangria total. O sangue foi colhido em tubos de polipropileno com ou sem 15 µL de anticoagulante Glistab® (Labtest cat. 29) para obtenção do plasma ou soro, respectivamente. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 10000 g por 15 minutos e o plasma ou soro guardados sob refrigeração (-4°C). O fígado dos animais foi extraído e uma parte foi imediatamente armazenada a -80°C para análise das defesas antioxidantes e dos marcadores do estresse oxidativo. A outra parte foi conservada em formol tamponado para as análises histológicas.

4.6 – DETERMINAÇÃO DE INSULINA SÉRICA

Para determinação da concentração de insulina sérica foi utilizado o kit comercial “Rat/Mouse Insulin ELISA kit” (Merck Millipore, USA). Este kit é sensível para

determinação de insulina em ratos, utilizando-se o método de “ELISA sanduiche” (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Resumidamente, nesta técnica, o anticorpo (anti-insulina) foi imobilizado na microplaca. A amostra (10 µL) contendo a insulina foi adicionada, reagindo com o anticorpo anti-insulina imobilizado. Após a lavagem de poços, um segundo anticorpo anti-insulina ligado a uma peroxidase foi adicionado, permitindo-se a reação com o complexo anticorpo/insulina presente na microplaca. Após o segundo anticorpo livre ser removido por lavagem, o substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foi adicionado, e o produto da reação colorido foi medido no leitor de microplaca a 450 e 590 nm. A concentração de insulina foi determinada pela interpolação usando a curva padrão gerada pela plotagem da absorbância versus a concentração correspondente do padrão de insulina de rato.

4.7 – ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO E PLASMA

Para a dosagem de glicose foi utilizado o plasma, as demais dosagens (colesterol total, triacilgliceróis, enzimas hepáticas (ALT e AST), creatinina e uréia) foram feitas com o soro. As dosagens foram realizadas a partir de kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil). Os protocolos das dosagens (ANEXO 3) foram realizados conforme manual do fabricante disponível no kit.

4.8 – ANÁLISE DAS DEFESAS ANTIOXIDANTES

4.8.1 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da superóxido dismutase total foi determinada utilizando o “Superoxide Dismutase assay Kit” (Chemical Cayman, MI, EUA). Resumidamente, 100 mg de tecido hepático foram homogeneizados em 1 mL de tampão HEPES 20 mM, gelado, pH 7,2, contendo 1mM de EGTA, 210 mM de sacarose e 70 mM de manitol. O homogenato foi centrifugado a 12.000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, e o sobrenadante foi retirado para ser utilizado como amostra biológica.

Para a realização do ensaio foi utilizado 10 µL de sobrenadante. A reação iniciou-se pela adição da xantina oxidase. A placa foi incubada em um agitador a temperatura ambiente por 20 minutos e a absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808).

4.8.2 – ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984).

Resumidamente, um fragmento de 100 mg de tecido hepático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno foram adicionados 50 μ L de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 μ L de água destilada e 10 μ L da amostra. A reação foi iniciada pela adição de 900 μ L de H_2O_2 (5 mM). As absorbâncias foram determinadas a cada minuto, durante três minutos, a 240 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

Uma unidade (U) de catalase é equivalente a hidrólise de 1mol de H_2O_2 ($\epsilon = 39,4$ L.mol⁻¹. cm⁻¹) por minuto (AEBI, 1984). Usualmente a atividade dessa enzima é representada em μ mol/mL de amostra. A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer. A absorbância utilizada para o cálculo é o delta obtido das três absorbâncias lidas (absorbância final – absorbância inicial).

4.8.3 – GLUTATIONA TOTAL E RAZÃO GSH/GSSG

A glutathiona está presente nas células principalmente na sua forma reduzida (GSH) representando em torno de 90%, o restante aparece na forma de glutathiona oxidada (GSSG). Esta dosagem foi adaptada do kit comercial Sigma #CS0260, e utiliza um método cinético para mensurar as concentrações de glutathiona total (GSH+GSSG) em amostras biológicas, através da redução do DTNB (Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico) à TNB.

Para realizar a dosagem, amostra de 100mg de tecido hepático foi homogeneizada com 1mL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA) e, em seguida centrifugado a 10.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Inicialmente foram adicionados aos poços 150 μ l da mistura de trabalho que contém glutathiona redutase, DTNB, e 100 mM tampão fosfato de potássio. Em seguida adicionou-se 10 μ l de amostra para os testes e 10 μ l de 100 mM tampão fosfato de potássio para o branco. As amostras foram incubadas por 5 minutos e em seguida a reação foi iniciada com a adição de 50 μ l de solução de NADPH. Com o início da reação, a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm utilizando um

leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 1 minuto entre cada leitura. A concentração de glutathiona total foi obtida através de uma curva padrão.

Para mensurar as concentrações de glutathiona oxidada, o procedimento é o mesmo, porém a amostra biológica passa por um processo de derivatização antes do início da dosagem. Para isso deve ser feito uma alíquota de 100 µl de amostra e acrescentar à esta 2 µl de vinilpiridina e 5 µl de TEA. Esta nova amostra deve ter o pH entre 6 e 7 e ficará incubada por uma hora. Após este período, utiliza-se 10 µl desta nova amostra para reagir com a mistura de trabalho, como anteriormente descrito. As concentrações de glutathiona total e oxidada são obtidas através de uma curva padrão realizada para cada uma das dosagens. A subtração da concentração de glutathiona oxidada do valor da concentração da glutathiona total fornece o valor da concentração da glutathiona reduzida.

4.8.4 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

A atividade da enzima glutathiona peroxidase foi mensurada utilizando o “Glutathione Peroxidase Activity Kit” (Assay Designs Inc., catalog #900-158, Michigan, EUA) adaptado. O ensaio é baseado na oxidação da glutathiona reduzida a oxidada catalisada pela enzima glutathiona peroxidase. A glutathiona oxidada por sua vez é reciclada e convertida de volta a glutathiona reduzida pela enzima glutathiona redutase, utilizando NADPH. O decréscimo na absorbância medida a 340nm durante a oxidação do NADPH a NADP^+ é indicativo da atividade de glutathiona peroxidase.

Para realizar a dosagem, uma amostra de 40mg de tecido hepático foi homogeneizado em 200 µl de tampão de ensaio proveniente do kit contendo 0,4 mM do inibidor de protease PMSF e 1% de Triton x-100. O homogenato foi centrifugado a 1.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

A dosagem foi realizada em microplaca de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 200µl do tampão de ensaio contido no kit com pH 7,0, 20 µl do mix de reação (contendo glutathiona reduzida, NADPH, glutathiona redutase e azida sódica), e 20 µl de amostra para os testes, padrão de glutathiona peroxidase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. A reação foi iniciada ao serem adicionados 20 µl de H_2O_2 a todos os poços. A absorbância foi imediatamente medida a 340 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 6 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Para cálculo da atividade de glutathiona peroxidase foi considerada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade em mmol/min/ml ou U/ml} = \frac{\Delta A_{340} \times \text{DF}}{6,22 \times V}$$

Onde:

Abs 340nm/minuto = Abs inicial – Abs final

ΔA_{340} = $\Delta A_{340}/\text{min}$ (branco) - $\Delta A_{340}/\text{min}$ (teste)

6,22 = ϵ mM do NADPH

DF = fator de diluição da amostra antes de adicionar à reação

V = volume da amostra em ml

4.8.5 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A atividade da enzima glutathiona redutase foi determinada utilizando o “Glutathione Reductase Assay kit” (Sigma, Missouri, EUA). O ensaio é baseado na redução da glutathiona pelo NADPH em presença de glutathiona redutase.

Uma amostra de 50mg de tecido hepático foi homogeneizada com 500 μ l de tampão proveniente do kit (10 mM fosfato de potássio pH 7,5, 1 mM EDTA e 1mg/ml de albumina bovina sérica). O homogenato foi centrifugado a 1.000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado como amostra.

O ensaio colorimétrico foi adaptado para ser realizado em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 125 μ l de 2 mM glutathiona oxidada, 40 μ l de tampão de ensaio proveniente do kit, 10 μ l de amostra para os testes, padrão de glutathiona redutase para o controle positivo, e tampão de ensaio para o branco. Em seguida foram adicionados 62,5 μ l de 3 mM DTNB e a reação foi iniciada ao adicionar 12,5 μ l de 2 mM NADPH em todos os poços. A absorbância foi imediatamente medida a 412 nm utilizando um leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808). Foram realizadas 11 leituras com intervalo de 10 segundos entre cada leitura.

Araujo, C.M.

Para o cálculo da atividade de glutatona redutase na amostra foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade da GR em Unidades/ml} = \frac{(\Delta A_{\text{amostra}} - \Delta A_{\text{branco}}) \times (\text{fator de diluição})}{\epsilon^{\text{mM}} \times \text{volume da amostra em ml}}$$

Onde, ϵ^{mM} do DTNB = 14,15mm-1cm⁻¹

4.9 –PROTEINAS TOTAIS

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de *Lowry et al.* (1951). O princípio do método baseia-se na redução do reagente de Folin Ciocalteau, ao reagir com aminoácidos aromáticos, catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azul.

Inicialmente são preparadas as soluções de trabalho conforme descrito abaixo:

- Reagente A: dissolve-se 0,25g de sulfato de cobre e 0,5 de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. A solução deve ser armazenada, no escuro, em temperatura ambiente.

- Reagente B: dissolve-se 5g de carbonato de sódio e 1g de hidróxido de sódio em 250mL de água destilada. Deve ser armazenada a temperatura ambiente.

- Reagente C: adiciona-se 1 mL do reagente A em 50mL do reagente B. Deve ser preparado na hora do teste.

- Reagente D: dissolve-se 1 mL de Folin-Ciocalteau em 1mL de água destilada. Deve ser preparado na hora do teste.

Foram realizados quatro pontos para a construção da curva padrão para proteínas totais, pelo seguinte procedimento:

P1- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 0,2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,05mg/mL.

P2- 7,5 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,15mg/mL.

P3- 15 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,30mg/mL.

P4- 25 μ L de uma solução estoque de proteínas a 2mg/dL e o volume completado com água destilada para 100mL. A concentração final obtida deste ponto é de 0,5mg/mL.

Para a realização da dosagem, foram adicionados 10 μ L de amostra ou padrão em tubos de polipropileno, e completados para 100 μ L com água destilada. O branco, usado para zerar o espectrofotômetro, foi feito apenas com 100 μ L de água destilada. Posteriormente adicionou-se 1 mL do reagente C em todos os tubos (incluindo branco e padrões). A mistura foi agitada no vórtex e mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foi adicionado em cada tubo 100 μ L do reagente D. O volume foi misturado e incubado a

temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 660nm.

Após as leituras, foi feito um gráfico expressando a concentração do padrão (Eixo Y) versus absorvância do padrão (Eixo X). A equação da reta gerada foi utilizada para determinar a concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos. Todas as concentrações foram obtidas em mg/mL.

4.10 – PROTEINA CARBONILADA

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína por EROs. Derivados carbonílicos podem ser mensurados por métodos sensitivos, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Este método reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, a qual pode ser analisada espectrofotometricamente (LEVINE *et al.*, 1994).

Para realização da dosagem, amostra de 400 mg de tecido hepático foi homogeneizada em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida o homogenato foi centrifugado a 10000g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado no procedimento experimental. 500 µL do sobrenadante do homogenato foram transferidos para dois tubos de polipropileno denominados, Amostra (A) e Controle (C). A cada tubo foi adicionado igual volume de ácido tricloroacético (TCA) 10% e após centrifugação a 5000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados ao tubo A 500 µL de DNPH 10 mM em 2 M de ácido clorídrico (HCl), e ao tubo C 500 µL de HCL 2 M. Ambos foram mantidos no escuro à temperatura ambiente por um período de 30 minutos sofrendo agitação a cada 15 minutos. No passo seguinte foram adicionados 500 µL de TCA 10% em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram novamente descartados. Os precipitados em ambos os tubos foram lavados com 1 mL da mistura etanol/acetato de etila, na proporção de 1:1, misturados no vórtex e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior, o sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foram adicionados em ambos os tubos 1 mL de SDS 6%, misturados no vórtex e centrifugados à 10.000 g por 10 minutos à 4°C. Finalmente as absorvâncias dos sobrenadantes foram determinadas a 370 nm. Os resultados são expressos em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína.

O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) segundo a lei de Lambert Beer.

$$A=C.b.\varepsilon$$

ONDE A É A SUBTRAÇÃO DA ABSORBÂNCIA DO TUBO A (AMOSTRA) PELA ABSORBÂNCIA DO TUBO C (CONTROLE), C É A CONCENTRAÇÃO, B É O CAMINHO ÓPTICO E E É O COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR.

4.11 – PARÂMETROS HISTOLÓGICOS

O fígado das ratas foi removido ao final de cada experimento e fixado em formol tamponado a 4%. Fragmentos de fígado de até 4mm de diâmetro foram fixados em uma solução de formaldeído 4%. Foram então desidratados e embebidos em parafina. O tecido hepático foi fixado e processado em série decrescente de álcoois e posteriormente embebido em parafina. Secções parafinadas de aproximadamente $4\mu\text{m}$ foram obtidas em micrótomo semiautomático, montadas e coradas pela técnica Hematoxilina & Eosina (H&E), para visualização de danos histológicos. As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica acoplado a câmera digital DM5000, com o software de análises Leica Application Suite.

4.12 – WESTERN BLOTTING E ZIMOGRAFIA

4.12.1 – PREPARO DO HOMOGENATO DO TECIDO

Os fígados das ratas foram pulverizados em nitrogênio líquido (-165°C). Em seguida, foram pesados e homogeneizados (na proporção de $100\text{mg}/400\mu\text{L}$) em tampão RIPA, acrescido de coquetel inibidor de protease (1:1000) a 4°C . Após a centrifugação (10 min, 10.000g), o sobrenadante foi coletado e usado imediatamente para dosagem de proteínas. A concentração proteica foi determinada utilizando-se uma curva padrão de albumina pelo método de *Lowry* (Lowry et al., 1951), utilizando-se o programa Microsoft Excel. A mesma quantidade de proteína total foi usada para *western blotting* e zimografia ($30 \mu\text{g}/\text{poço}$).

4.12.2 – SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

Após a medida da concentração proteica, o volume necessário para obtenção total de 30 µg de proteína para cada amostra foi acrescentado (de acordo com cálculos realizados para cada amostra, pois há variação de volume) tampão *RIPA* [(150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and 50 mM Tris, pH 8.0. It is also compatible with EZview™ Red Affinity Gels)] e tampão de amostra para SDS-PAGE [Tris-HCl 0,125M pH 6,8, SDS 4% (w/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 0,1M e azul de bromofenol 0,02% (w/v)]. Antes da aplicação no gel (SDS-PAGE 8%) em placas de 1,5mm, as amostras são fervidas a 100°C por 5 minutos no banho seco, desnaturando as proteínas, desenovelando-as completamente, a fim de facilitar a separação das mesmas durante a corrida eletroforética. Um volume de 10 µL do marcador padrão de massa molecular (*BLUeye Prestained Protein Ladder - Genedirex*) foi utilizado em todas as corridas.

A corrida da eletroforese foi realizada durante 120 minutos a 100 V e em seguida as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Immun-Blot® 0,22mm BIO-RAD) através do sistema de transferência *Mini Trans-Blot Cell* (BioRad) em tampão Tris-HCl (25 mM), glicina (92 mM), metanol (20%) e SDS (0,1%). A transferência foi realizada a 350 mA (mili-Ampéres) durante uma hora.

Após a transferência proteica para as membranas, estas foram mantidas em solução de bloqueio [5% de leite em pó desnatado em *TBST 1X* (Tris HCl pH 7,6 (1 mM), NaCl (5 M) e 1 mL de Tween 20)] por uma hora. As membranas foram então incubadas em solução do anticorpo primário monoclonal anti-MMP-2 (Millipore MAB3308) (1:1000), GAPDH (2118 Cellular Signaling) (1:5000), por uma hora, seguido pela incubação em solução do anticorpo secundário *Goat Anti-Mouse IgG-HRP CLC554002* (Cedarlane) (1:5000) ou *Goat Anti-Rabbit IgG-HRP CLCC42007* (Cedarlane) (1:10000) por uma hora. A diluição dos anticorpos foi realizada em solução de bloqueio e a incubação em temperatura ambiente, com leve agitação em plataforma agitadora.

A visualização das bandas foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente *ECL* (Amersham, EUA) e de filmes de raios-x ultra-sensíveis (Kodak e Fujifilm). Os filmes de auto-radiografia foram expostos às membranas e revelados utilizando protocolos de tempo já previamente padronizados no laboratório de farmacologia da *University of Alberta*, sendo que todos os procedimentos foram realizados em sala escura.

4.12.3 – ZIMOGRAFIA

As zimografias foram executadas segundo protocolo previamente descrito por SUNG *et al*, 2007 em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 8% contendo gelatina do tipo A de pele suína (Sigma Chem. Co, St. Louis, Mo. EUA) na concentração de 2 mg/mL e os géis de entrada poliacrilamida 5% (w/v) em placas de 0,75mm. A eletroforese foi realizada com a concentração de 30µg de proteína para cada amostra, acrescido (de acordo com cálculos realizados para cada amostra, pois a variação de volume) de tampão RIPA e tampão de amostra para SDS-PAGE. Antes da aplicação no gel as mesmas foram aquecidas por dois minutos a 37°C banho úmido. Um volume de 10 µL do marcador padrão de massa molecular (*BLUeye Prestained Protein Ladder – Genedirex*) foi utilizado em todas as corridas.

A corrida da eletroforese foi realizada durante 120 minutos a 100 V no mesmo sistema utilizado para o *western blotting*. Após a eletroforese os géis foram cuidadosamente lavados 3 vezes em 2.5% Triton X-100 para total remoção do SDS seguido de incubação a 37°C por 18h em tampão contendo o substrato (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% NaN₃ (pH 7.5). SDS é o agente responsável pela ativação das metaloproteases mesmo na forma inativa sem clivagem proteolítica (Talhouk *et al.*, 1991). Os géis foram corados com 0.05% Coomassie Brilliant blue G-250 por 3 horas e descorados com solução descorante (4% metanol, 8% ácido acético e água). A atividade da gelatinase foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. As metaloproteases são secretadas na forma latente e necessitam da clivagem do terminal peptídico NH₂ para ativação.

4.12.4 – DENSITOMETRIA DAS BANDAS PARA *WESTERN BLOTTING* E ZIMOGRAFIA

Após descorar o gel da zimografia e após a revelação da membrana no experimento de *Western Blotting*, as bandas marcadas foram quantificadas com auxílio do software *Quantity One* (BioRad) utilizando uma estação de captura de imagem (*Carestream 4000 MM Pro Image Station*) e do software *ImageJ* versão 1.32j de domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/> onde a densidade óptica de cada banda foi detectada. Utiliza-se como parâmetro para análise o volume ajustado das bandas, que significa o volume total, diminuído do *background*. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade óptica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar outra banda.

4.13 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos a testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Todos dados apresentaram distribuição normal e foram analisados através da análise de variância univariada *One-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises foram realizada no software *GraphPad Prism 5.0* para Windows (San Diego, California, USA).

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

5.1 – ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E ESPECTRAL DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *MORUS NIGRA*

As preparações do extrato e da polpa das folhas de *Morus nigra* foram analisadas por CLAE-DAD-EM. Os resultados mostrados nas Figuras 5 e 6 e nas Tabelas 1 e 2 indicam as substâncias fenólicas que foram identificadas na polpa e no extrato de *Morus nigra* respectivamente, incluindo os heterosídeos de flavonoides. As estruturas químicas dos compostos encontrados na composição da polpa e do extrato das folhas de *Morus nigra*, estão representadas na figura 7. No extrato das folhas foram identificados também isômeros de ácido cafeoilquínico. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os resultados descritos na literatura. As buscas foram realizadas nas bases de dados dispoconcentrações pela razão m/z obtida nos espectros.

Apesar da diferença entre os compostos do fruto e da folha, vale ressaltar que ambas são compostas com alta capacidade antioxidante e apesar das diferenças dos resultados, os compostos da polpa e da folha são muito valiosos no combate ao estresse oxidativo.

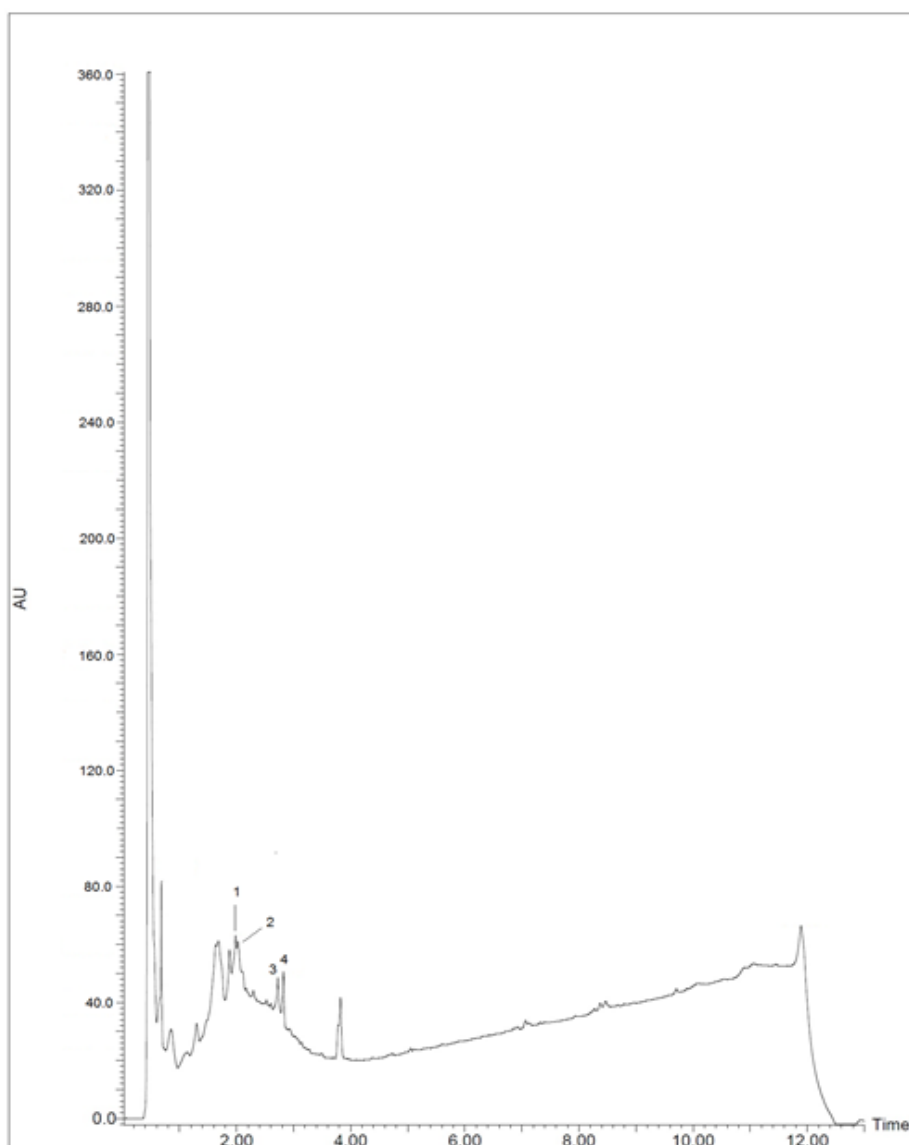


Figura 5: Perfil da polpa de *Morus nigra* Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1,7 mm, 50 x 3 mm) id. A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 3.50kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Usou-se nitrogênio como gás de bainha com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. Análise de massa foi realizada no modo de varrimento total 100-1,500 amu, tanto no modo positivo e negativo. 1. Cianidina 3-O-glicosídeo; 2. Cianidina 3-O-glicosil-ramnoside; 3. Quercetina 3-O- glicosídeo / Quercetina 7-O- glicosídeo; 4. Quercetina 7-O- glicosídeo / Quercetina 3-O-glicosídeo.

Tabela 1: Flavonoides identificados na polpa de *Morus nigra*

Sinal	Composto	TR (min)	UV (nm)	LC-MS	LC-MS
				[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)
1	Cianidina 3-O-glicosídeo	1.99	280.1	447.32	449.38 (287.0)
2	Cianidina 3-O-glicosil- ramnosídeo	2.10	281.1	593.21	595.42 (449.1; 287.1)
3	Quercetina 3-O-glicosídeo/ Quercetina 7-O-glicosídeo	2.71	255.1; 359.1	463.53 (301.1)	465.35 (303.2)
4	Quercetina 7-O-glicosídeo/ Quercetina 3-O-glicosídeo	2.82	254.1; 358.1	463.25 (301.0)	465.48 (303.4)

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]⁻(m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, LC-MS [M+H]⁺ (m/z) m/z: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo positivo, razão massa/carga

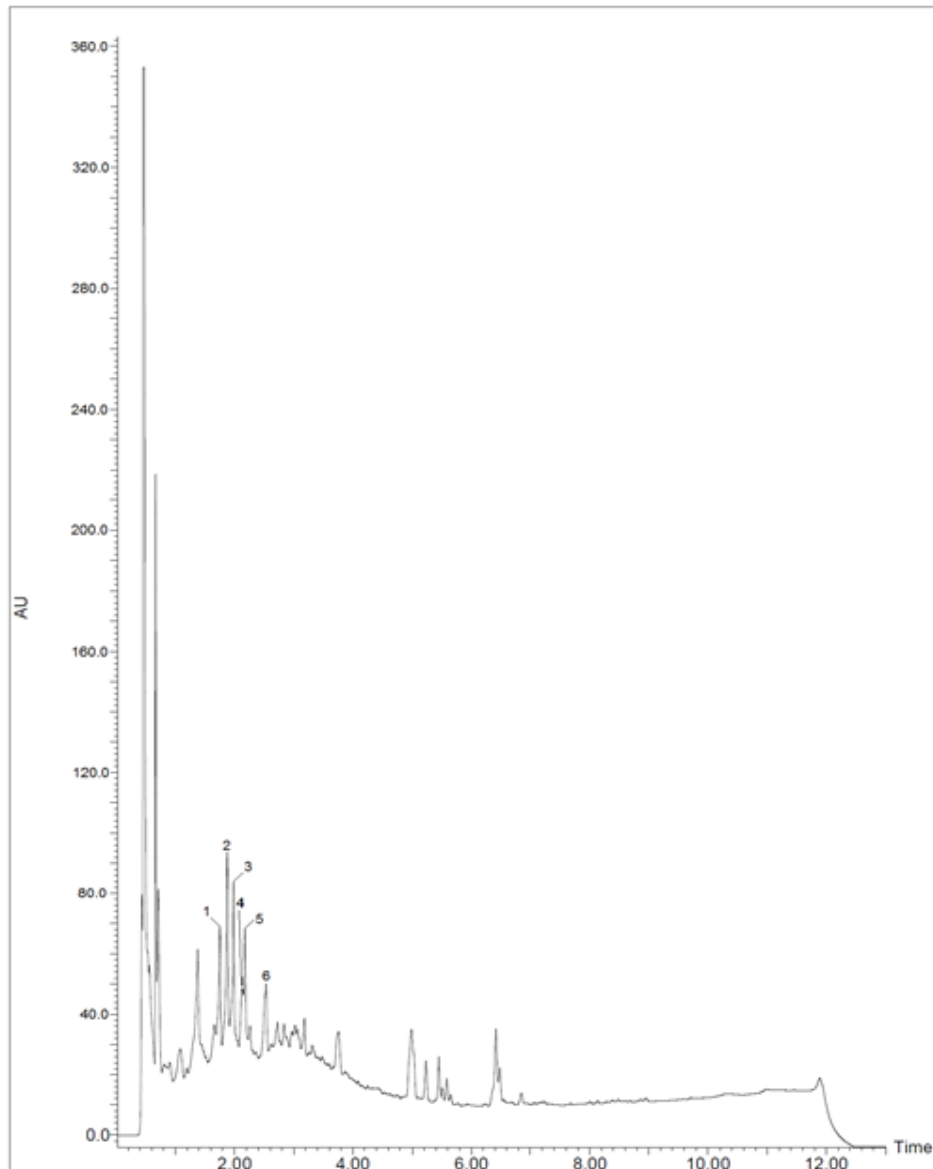


Figura 6: Perfil do extrato das folhas de *Morus nigra* Condições: CHS130 100 RP-18 de coluna (1,7 mm, 50 x 3 mm) id. A eluição foi realizada com um gradiente linear de água 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo 0,1% de ácido fórmico (B) (a partir de 5% a 95% de B, em 11 min) e as impressões digitais UPLC foram registradas em um aparelho Waters Acquity com um detector UV-DAD (Waters 2996). Parâmetros de funcionamento do espectrômetro de massa foram: temperatura capilar 320°C; voltagem da agulha de spray fixada em 3.50kV; ES tensão capilar 3 e - 47V para polaridade positiva e negativa, respectivamente; e lente do tubo deslocamento 0 e -25V para polaridade positiva e negativa, respectivamente. Usou-se nitrogênio como gás de bainha com um fluxo de 50 unidades arbitrárias. Análise de massa foi realizada no modo de varrimento total 100-1,500 amu, tanto no modo positivo e negativo. 1. Ácido 3-O-cafeoilquínico; 2. Ácido 4-O-cafeoilquínico; 3. Ácido 5-O-cafeoilquínico; 4. Luteolina-7-O-gentiobiosídeo; 5. 6-Hidroxi-luteolina-7-O-rutenosídeo; 6. Quercetina-3-O-furanosil-2''-ramnosil

Araujo, C.M.

Tabela 2: Flavonoides identificados no extrato das folhas de *Morus nigra*

Sinal	Composto	TR (min)	UV (nm)	LC-MS	LC-MS
				[M-H] ⁻ (m/z)	[M+H] ⁺ (m/z)
1	Ácido 3-O- cafeoilquínico	1.76	323.1	353.38 (191.1; 179.0; 134.8)	355.39
2	Ácido 4-O- cafeoilquínico	1.88	321.1	353.38 (191.1; 179.0; 135.2)	355.72
3	Ácido 5-O- cafeoilquínico	1.99	323.1	353.38 (190.8; 179.0; 135.0)	355.92
4	Luteolina-7-O- gentiobiosídeo	2.15	255.1; 328.1	609.37 (447.2; 285.3)	611.44
5	6-Hidroxi-luteolina-7- O-rutenosídeo	2.17	265.3; 327.8	609.58 (301.0)	611.51
6	Quercetina-3-O- furanosil-2''-ramnosil	2.53	264.1; 357.8	579.21 (433.8; 301.0; 277.0)	581.72

TR (min): tempo de retenção em minutos, UV (nm): ultra violeta em nanômetros, LC-MS [M-H]⁻ (m/z): cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo negativo, LC-MS [M+H]⁺ (m/z) m/z: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em modo positivo, razão massa/carga

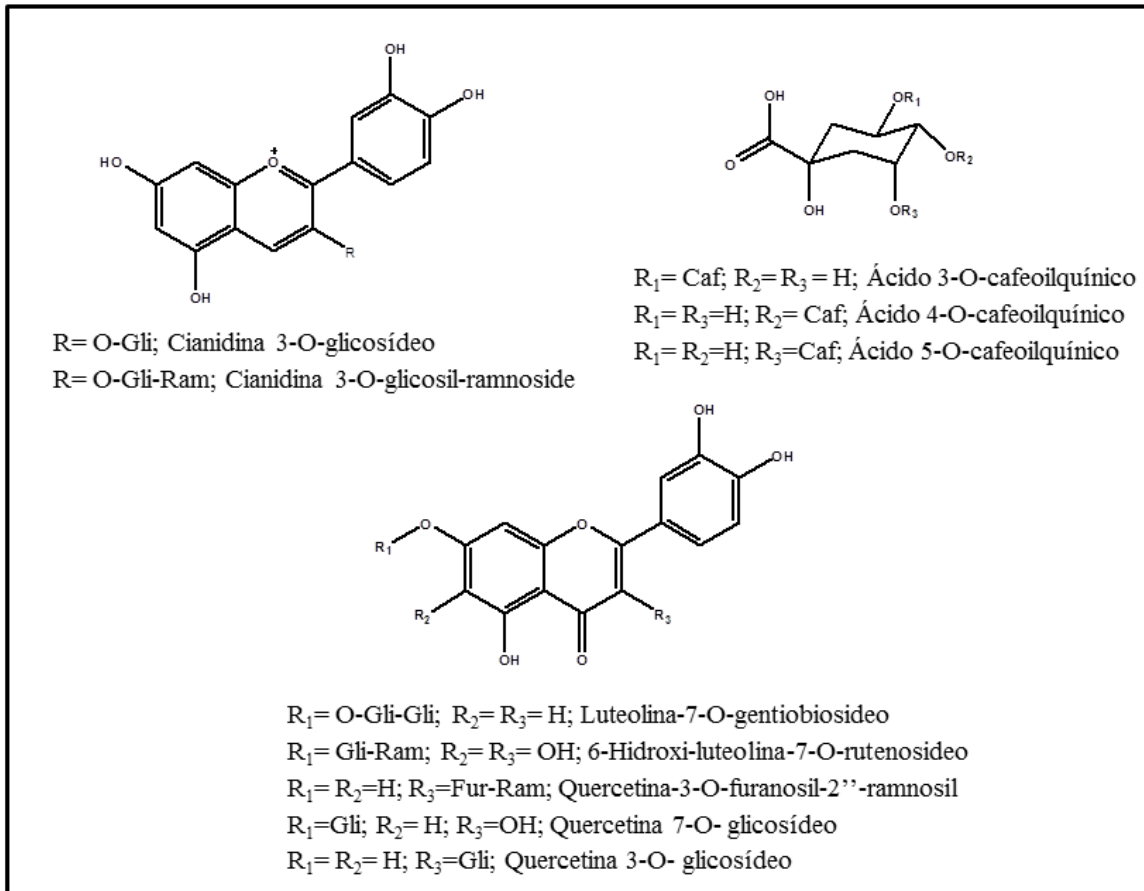


Figura 7: Estruturas químicas dos compostos encontrados na composição da polpa e do extrato das folhas de *Morus nigra*. Fonte: Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

5.2 – DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS E ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXANTE *IN VITRO* DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *MORUS NIGRA*

Através da determinação de polifenóis totais verificamos que o extrato das folhas de amora possui uma maior concentração desses compostos em relação à polpa como mostrado na Figura 8A.

A capacidade antioxidante da polpa e do extrato das folhas de *Morus nigra* e também do antioxidante de referência trolox foi determinada em diferentes concentrações e expressa em percentual de atividade antioxidante (%AA), que corresponde à quantidade do radical DPPH• consumido pelo antioxidante. Podemos observar através da figura 8B que tanto a polpa quanto a folha da amora apresentam atividade antioxidante, especialmente nas amostras menos diluídas. Entretanto, vale ressaltar que a capacidade antioxidante do extrato das folhas é superior à da polpa de amora ao se comparar as mesmas diluições.

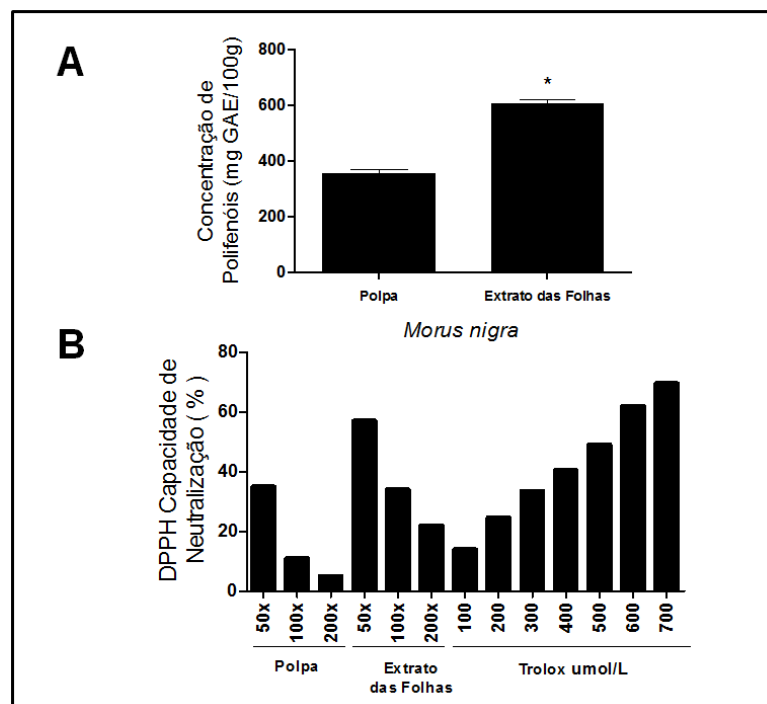


Figura 8: Capacidade antioxidante da *Morus nigra*: Painel A representa a concentração de polifenóis totais (valores são expressos em mg de ácido gálico). Painel B representa o percentual de atividade antioxidante da polpa, do extrato da folha de amora e do antioxidante de referência Trolox em diferentes diluições e concentrações, respectivamente, avaliadas em 30 minutos.

5.3 – AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E PESO DO FÍGADO

Os dados expressos na tabela 3 mostram que os grupos D, DP e DF apresentaram uma perda de peso significativa, ao final do experimento, em relação ao grupo C. Observamos também que o fígado dos animais do grupo D não tratado apresentou um aumento de peso em 12,5% em relação aos demais grupos, mesmo não havendo diferença estatística.

Tabela 3: Médias dos pesos inicial, final e dos fígados dos grupos C, D, DP, DF.

Peso (g)	Grupos Experimentais			
	C	D	DP	DF
Inicial	187,10±5,78	181,50±5,03	182,70±5,42	182,90±4,42
Final	196,71±6,81 ^a	165,61±4,14 ^b	163,82±11,10 ^b	162,85±12,28 ^b
Fígado	7,22±0,38	8,02±0,35	7,21±0,37	7,36±0,47

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão C=Controle, D=Diabético, DP=Diabético tratado com polpa e DF=Diabético tratado com extrato das folhas. One-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.4 – GLICEMIA E INSULINEMIA

Os resultados expressos na figura 9A mostram que houve um aumento significativo na glicemia dos animais diabéticos (D) em relação aos animais do grupo controle (C). O tratamento de animais diabéticos com extrato de folhas de amora diminuiu significativamente a glicemia destes animais em relação aos animais do grupo diabético (D). O grupo tratado com polpa de amora (DP) não mostrou diferença em relação aos grupos D e DF. Os grupos dos animais diabéticos (D, DP e DF) foram diferentes do grupo controle (C).

Em relação aas concentrações séricas de insulina (figura 9B) pôde-se observar que houve uma diminuição significativa na concentração de insulina no grupo de animais diabéticos (D) em relação aos animais do grupo controle (C). Também observamos um aumento significativo na insulinemia no grupo dos animais diabéticos tratados com extrato de folhas de amora (DF) em relação ao grupo de animais diabéticos não tratado (D). Além disto, podemos observar que a insulinemia do grupo DF é estatisticamente igual ao grupo C. Não observamos diferença na concentração de insulina entre os animais dos grupos D e DP.

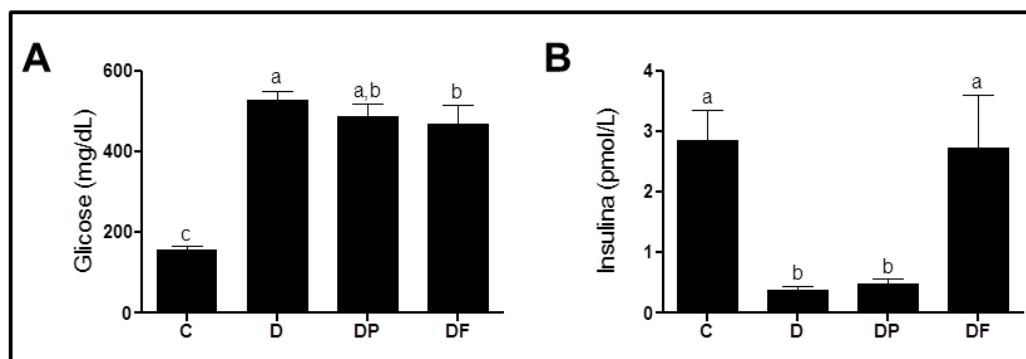


Figura 9: Avaliação das concentrações de glicose no soro (A) e insulina no plasma (B) em ratos dos grupos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.5 – PERFIL LIPÍDICO

Com o intuito de avaliarmos o perfil lipídico dos animais foi realizada a determinação das concentrações de colesterol total, colesterol HDL, fração aterogênia (colesterol total – colesterol HDL) e triacilgliceróis. Os resultados da figura 10A mostram que os animais dos grupos DP e DF tiveram uma redução significativa nas concentrações de colesterol total quando comparados aos animais do grupo C. No entanto, não se observou diferença significativa na concentração de colesterol total nos animais do grupo D em relação aos animais dos grupos C, DP e DF.

Em relação ao HDL, observou-se redução nas concentrações dessa lipoproteína nos animais dos grupos D, DP e DF em relação aos animais do grupo C (figura 10B).

No que diz respeito ao perfil lipídico, os animais diabéticos mostraram uma diminuição na concentração do colesterol total, mas, provavelmente, esta redução está associada ao decréscimo da fração de colesterol HDL. O tratamento com a polpa e o extrato de folhas não melhorou estes parâmetros.

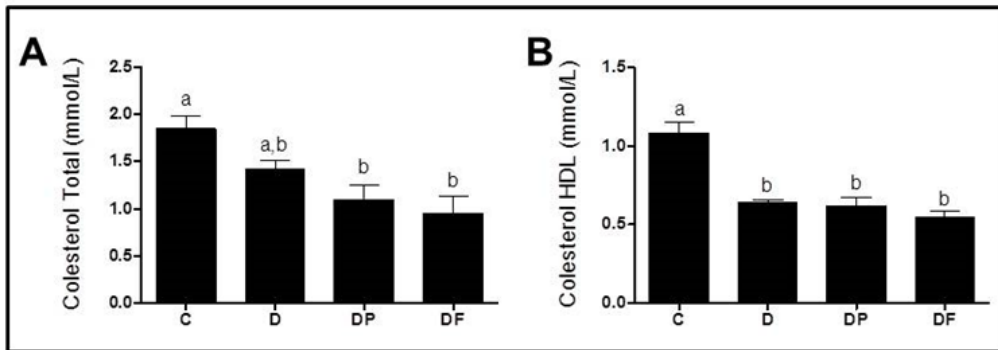


Figura 10: Concentrações séricas de colesterol total (A) e HDL (B) em ratos dos grupos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

Como pode ser observado na figura 11, não houve alterações significativas nas concentrações de triacilgliceróis (painel A) e de fração aterogênica (painel B) entre os grupos experimentais. Mas mesmo não havendo diferença estatística houve um aumento de 55% na concentração de triacilglicerol no grupo D em comparação com os animais do grupo controle. O tratamento com o extrato das folhas diminuiu a concentração de triacilglicerol em 23% em relação aos animais do grupo D.

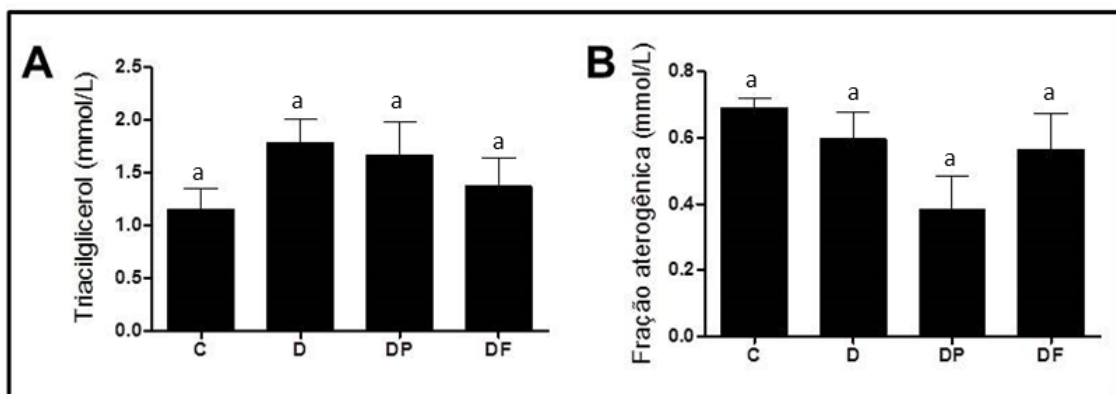


Figura 11: Triacilgliceróis (A) e fração aterogênica (B) em ratos dos grupos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.6– ANÁLISE DA FUNÇÃO HEPÁTICA

Os resultados da figura 12 mostram as dosagens das enzimas hepáticas. No painel A observa-se a atividade da enzima alanina amino transferase (ALT) e no painel B observa-se a atividade da enzima aspartato amino transferase (AST). Os animais dos grupos diabéticos (D e DP) apresentaram aumento significativo em ambas as enzimas quando comparados aos animais do grupo C. No entanto, o tratamento com o extrato das folhas conduziu a 33 % e 47% de decréscimo nas concentrações de ALT e AST, respectivamente, em ratos diabéticos.

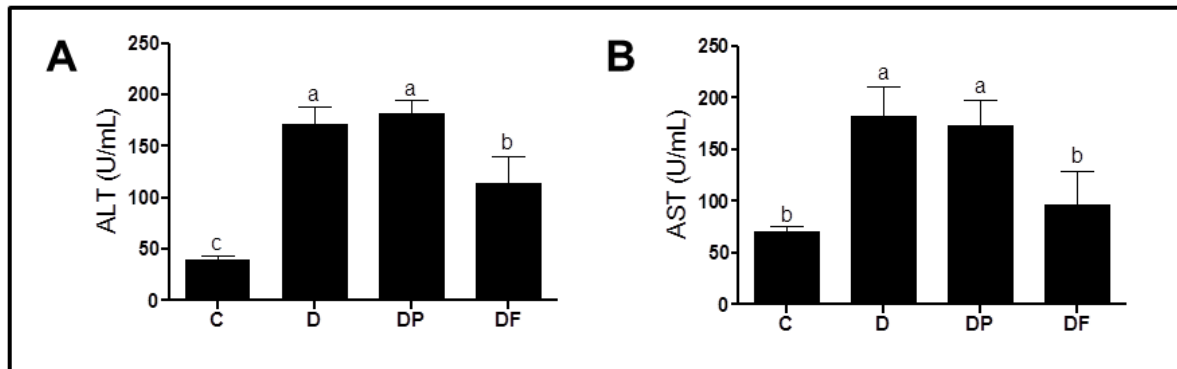


Figura 12: Atividade da alanina aminotransferase (ALT) (A) e da aspartato aminotransferase (AST) (B) em ratos dos grupos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.7– ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL

A função renal (figura 13) foi avaliada através da dosagem de creatinina (painel A) e uréia (painel B). No painel A não foi observada nenhuma diferença significativa em relação à creatinina em nenhum dos grupos estudados. Já no painel B observamos que houve um aumento significativo na produção de uréia nos grupos D e DP em relação ao grupo controle. O tratamento com o extrato das folhas diminuiu significativamente a concentração de uréia em relação aos animais diabéticos não tratados.

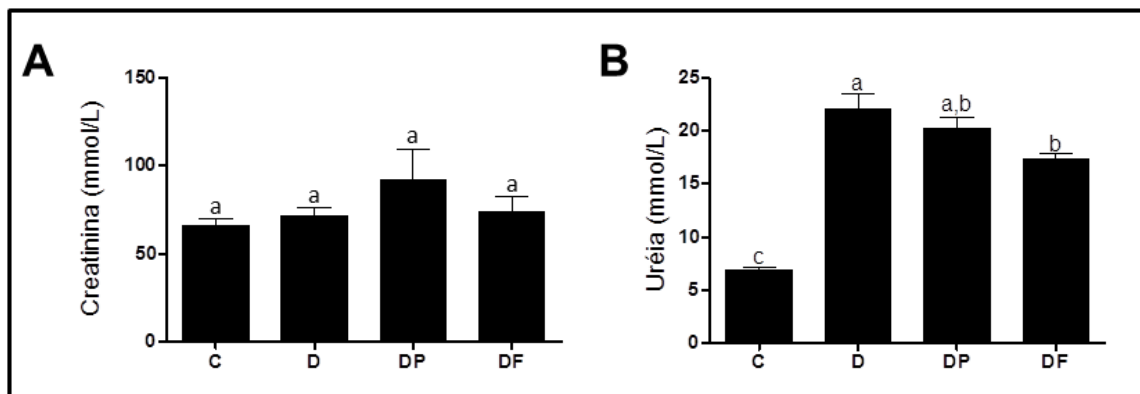


Figura 13: Concentração sérica de creatinina (A) e uréia (B) em ratas dos grupos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.8– EFEITO DA POLPA E DO EXTRATO DAS FOLHAS SOBRE MARCADORES DO *STATUS REDOX* NO FÍGADO

5.8.1– PERFIL ANTIOXIDANTE

Para mensurar o perfil antioxidante no tecido hepático avaliamos a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT). Os resultados da figura 14 mostram um aumento na atividade de SOD (painel A) e uma diminuição na atividade da CAT (painel B) nos animais diabéticos, aumentando significativamente a razão SOD/CAT nestes animais quando comparados aos animais do grupo controle (painel C). Os resultados do painel A mostram uma diminuição significativa na atividade de SOD nos grupos DP e DF quando comparados aos animais do grupo diabético sem tratamento. Já no painel B podemos perceber que houve um aumento significativo na atividade da catalase nos grupos DP e DF quando comparado ao grupo diabético. Além disto, a atividade da catalase nos grupos DP e DF foram estatisticamente igual ao grupo controle. Estes resultados analisados em conjunto nos sugerem que o tratamento com a polpa e extrato das folhas de amoreira restaura a razão SOD/CAT aas concentrações dos animais do grupo controle (painel C).

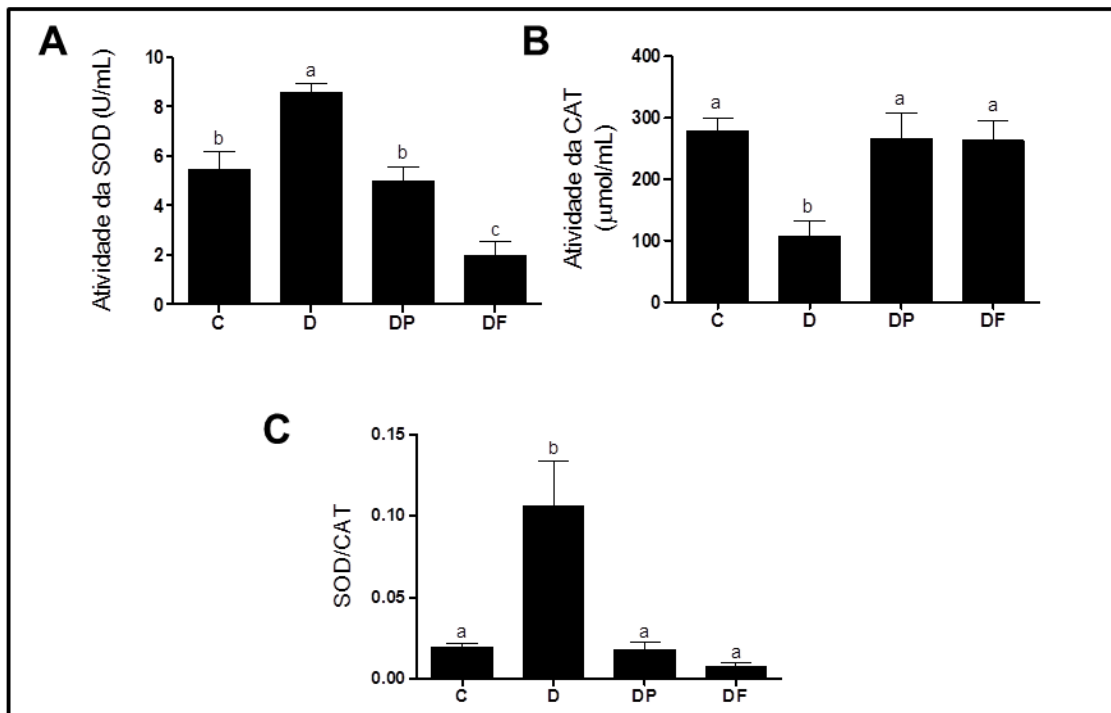


Figura 14: Perfil Antioxidante: Atividade da SOD (U/mL) (A), Atividade da CAT ($\mu\text{mol/mL}$) (B) e razão SOD/CAT em fígado de ratos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.8.2– GLUTATIONA TOTAL E RAZÃO GSH/GSSG

Em relação ao metabolismo da glutatona no tecido hepático avaliamos a concentração de glutatona total (painel A) e a razão GSH/GSSG (painel B). Os resultados da figura 15 painel A mostram que não houve alteração na concentração de glutatona total em nenhum dos grupos avaliados. Entretanto, no painel B observamos uma diminuição na razão GSH/GSSG nos animais diabéticos quando comparados aos animais do grupo controle. O tratamento com o extrato de folhas de *Morus nigra* apresentou uma tendência em aumentar a razão GSH/GSSG, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Estes resultados analisados em conjunto nos sugerem que o tratamento com a polpa e extrato das folhas de amoreira não restaura as concentrações das glutatonas total. No entanto a diminuição da razão GSH/GSSG observado em animais diabéticos é minimizado com o tratamento com o extrato das folhas de *Morus nigra* (painel B).

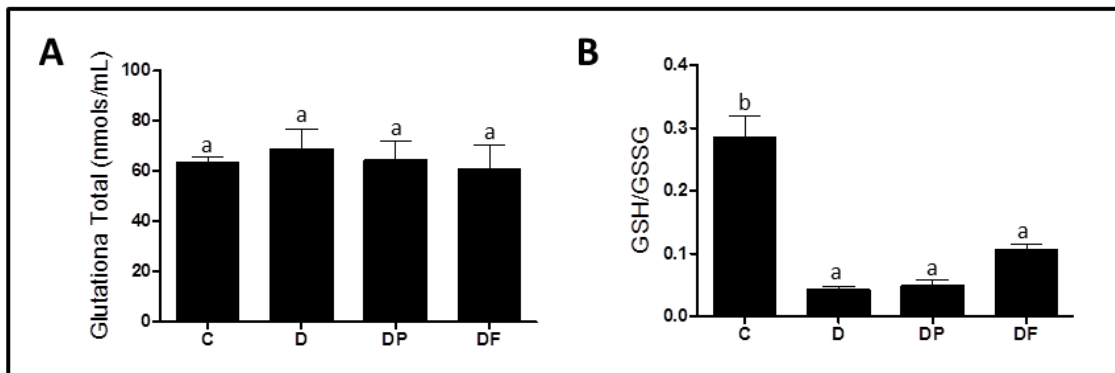


Figura 15: Status Redox: Conteúdo de Glutathione Total (nmols/mL) (A), Razão GSH/GSSG (B) em fígado de ratos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.8.3– Glutationa peroxidase (GPx) e Glutationa redutase (GR)

A fim de avaliar a neutralização do peróxido de hidrogênio bem como a conversão da GSH para seu estado oxidado e a da GSSG para o seu estado reduzido, foram avaliadas a atividade das enzimas GPx (painel A) e GR (painel B), respectivamente.

Na análise comparativa entre os gráficos da figura 16 painéis A e B podemos observar que a atividade de GR é dez vezes maior que a atividade de GPx. Além disto, observamos que não houve diferença significativa na atividade destas enzimas entre os grupos experimentais.

Estes resultados analisados em conjunto nos sugerem que o tratamento com a polpa e extrato das folhas de amoreira não altera a atividade dessas enzimas.

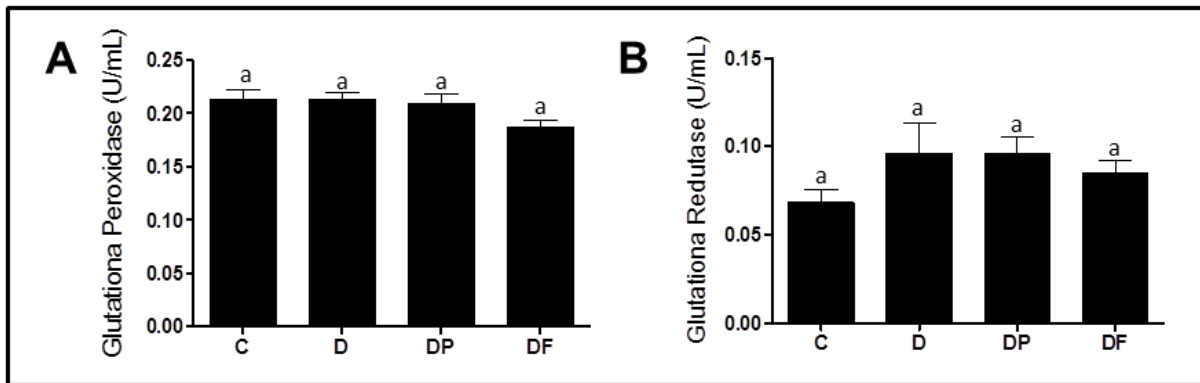


Figura 16: Atividade da Glutationa Peroxidase (U/mL) (A), Atividade da Glutationa Redutase (U/mL) (B), em fígado de ratas controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amoreira (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.9 – AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO EM PROTEINAS

Para mensurar o dano oxidativo às proteínas, avaliamos as concentrações de proteína carbonilada no tecido hepático. Os resultados da figura 17 mostram um aumento da concentração de proteína carbonilada no fígado de animais diabéticos e uma redução significativa dessas concentrações nos grupos tratados com a polpa e o extrato das folhas quando comparados ao grupo diabético. Os tratamentos com o extrato das folhas e com a polpa foram eficazes na redução dos danos oxidativos em proteínas. Estes resultados nos sugerem que o tratamento com a polpa e extrato das folhas de amoreira restaura as concentrações de proteína carbonilada dos grupos tratados as concentrações do grupo controle, amenizando os danos causados pelo diabetes.

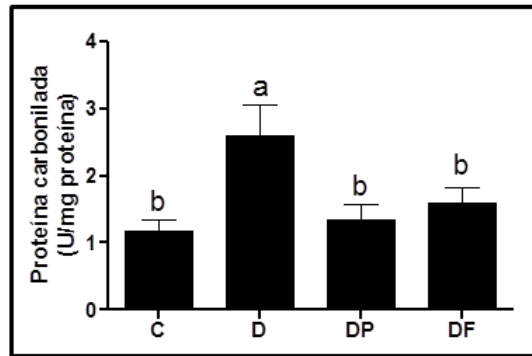


Figura 17: Concentrações de Proteína Carbonilada em fígado de ratos controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amoreira (DF) por 30 dias. Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

5.10 – ANÁLISE HISTOLÓGICA

Histologicamente, na avaliação em microscopia óptica dos tecidos corados em Hematoxilina & Eosina (H&E) não foram reveladas alterações significativas na estrutura tecidual hepática. O quadro histológico geral encontrado foi sempre compatível com a normalidade. Não foram encontradas áreas de morte celular (necrose ou células em apoptose), sinais inflamatórios, áreas degenerativas ou fibróticas em nenhum dos animais dos grupos experimentais, tanto nas veias centro lobulares (VCL) quanto nos espaços porta (EP). (Figura 18).

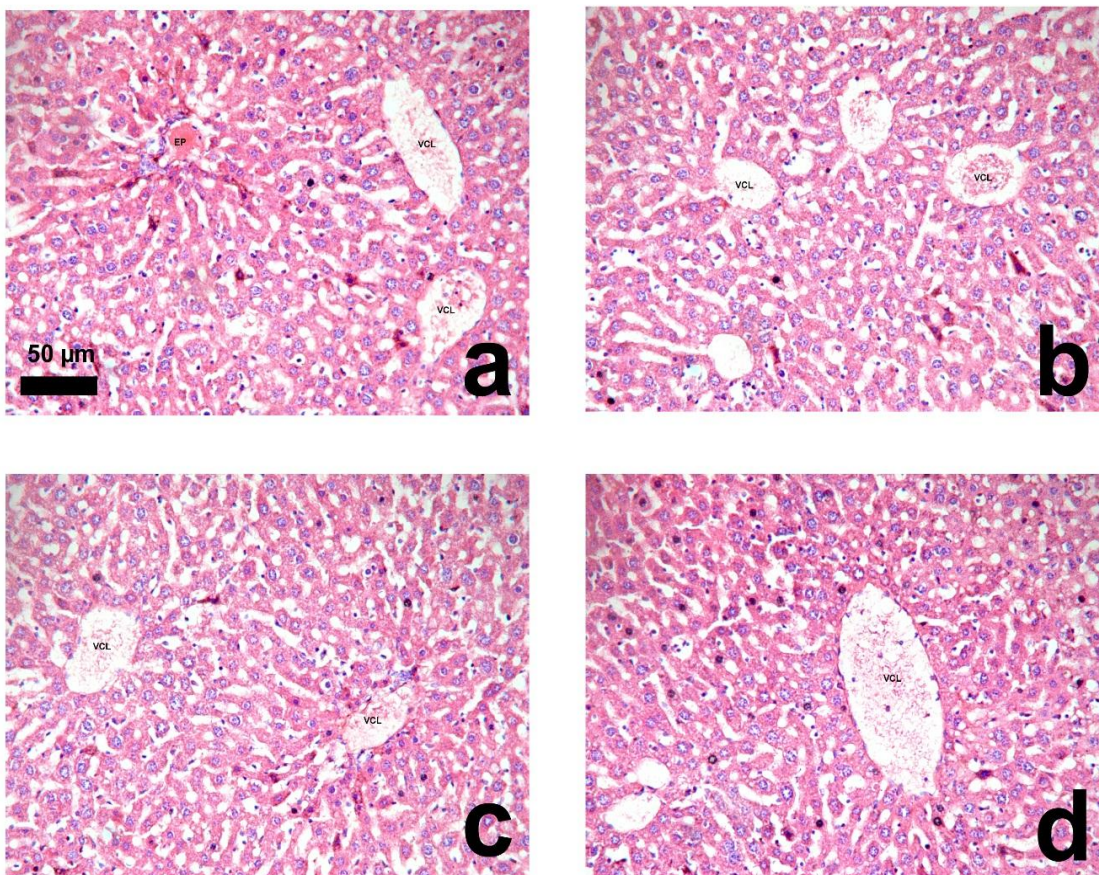


Figura 18: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de fígado. Controle (a), diabético (b), diabético tratado com polpa (c) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (d). Barra = 50 micrometros. VCL = Veia Centro Lobular. EP = Espaço porta Coloração Hematoxilina & Eosina.

5.11 – MMP-2 E MMP-9

As metaloproteinases de matriz são conhecidas por seu importante papel no remodelamento da matriz extracelular. Os resultados da figura 19 (painel B) indica que ocorreu um aumento na atividade da MMP-2 no fígado das ratas diabéticas e das ratas diabéticas tratadas com polpa de fruta quando comparado ao grupo controle. No entanto o grupo tratado com extrato das folhas mostrou uma redução significativa na atividade desta enzima, sendo estatisticamente igual ao grupo controle. Não houve alteração na atividade da MMP-9 em qualquer um dos grupos experimentais (painel D). Os painéis A e C mostram imagens representativas dos géis da zimografia.

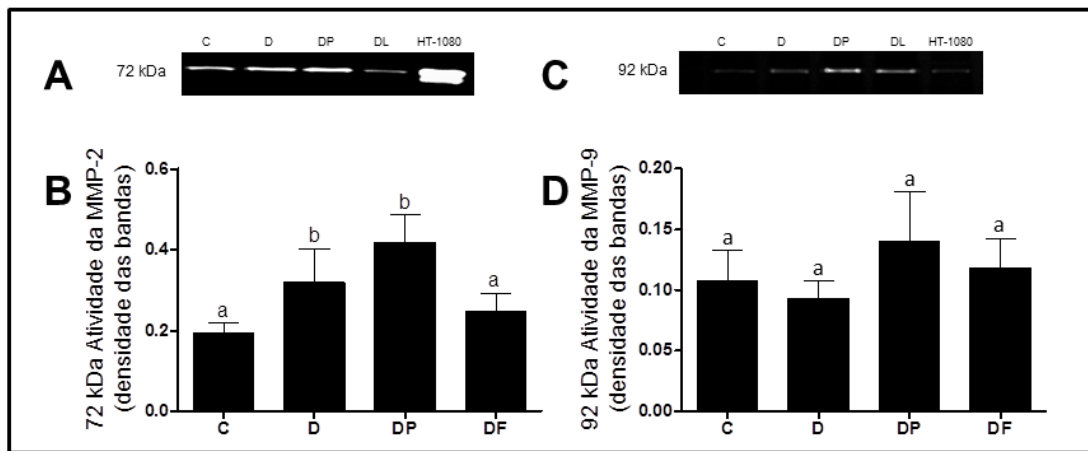


Figura 19: Análise da atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9. Imagem representativa das bandas de MMP-2 no gel (A), Análise da Atividade de MMP-2 em homogenato de tecido hepático (B), Imagem representativa das bandas de MMP-9 no gel (C), Atividade de MMP-9 em homogenato de tecido hepático (D) em ratas controle (C), diabéticas (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. (HT-1080: Fibrosarcoma Humano). Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

Os resultados da figura 20 (painel B) indica que ocorreu aumento da expressão da MMP-2 no fígado das ratas diabéticas (D) e das ratas diabéticas tratadas com polpa da fruta (DP). No entanto o grupo tratado com extrato das folhas mostrou uma redução significativa da expressão desta enzima, sendo estatisticamente igual ao grupo controle. No painel A temos a foto representativa dos filmes do *wester blot*, mostrando a MMP-2 e o GAPDH que foi utilizado como normalizador endógeno. Sendo assim, podemos sugerir que o tratamento com o extrato das folhas da amora reduziu a expressão proteica da MMP-2, corroborando com os resultados encontrados na zimografia gelatinolítica.

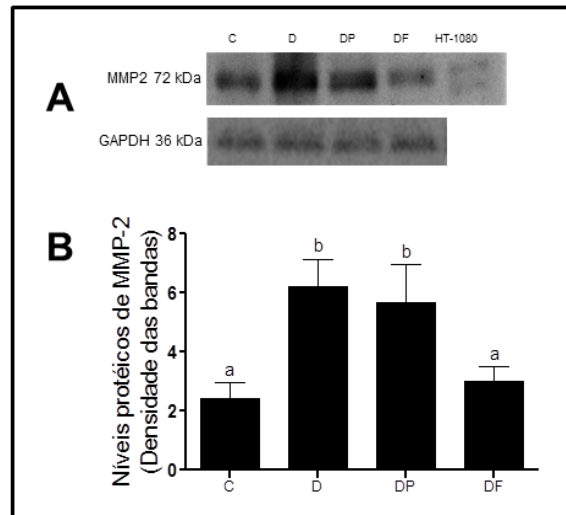


Figura 20: Avaliação da expressão proteica de MMP-2. Imagem representativa das bandas de MMP-2 e GAPDH em filme de raio-X (A), Western blot: 30 µg proteína por well análise das concentrações da proteína MMP-2 em homogenato de tecido hepático (B), em ratas controle (C), diabético (D), diabético tratado com polpa (DP) e diabético tratado com extrato das folhas de amora (DF) por 30 dias. (HT-1080: Fibrosarcoma Humano). Foram realizados os testes One-way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey para determinação das diferenças entre os grupos. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão, os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não existe diferença entre os grupos.

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO

O modelo experimental de DM é muito utilizado e contribui para o melhor entendimento da sua fisiopatologia em humanos. Diversos agentes químicos são utilizados para desenvolvê-lo em animais, dentre os quais, destacam-se o aloxano e a estreptozotocina (DIAS *et al.*, 2004).

O DM é uma síndrome causada por distúrbios metabólicos, decorrentes de problemas na ação e/ou secreção da insulina, caracterizada por uma hiperglicemia crônica (SBD, 2013). Mecanismos bioquímicos e patológicos estão associados à hiperglicemia e o aumento do estresse oxidativo apresenta um papel central nesta desordem. Evidências sugerem que a lesão celular oxidativa causada pelas espécies reativas contribuem para o desenvolvimento das complicações no DM tipo 1 e a diminuição das defesas antioxidantes parecem correlacionar-se com a gravidade das alterações patológicas encontradas nesta doença (NOGUEIRA-MACHADO *et al.*, 2008).

Mesmo com todos os avanços na pesquisa, a terapia com a insulina é a única alternativa para o tratamento convencional de diabetes mellitus tipo 1. No entanto, este tratamento tem limitações, causa desconforto ao paciente e é caro. Assim, vários estudos têm sido realizados para identificar plantas com atividades hipoglicemiantes e antidiabéticas que melhorem as complicações causadas pela doença (OKPASHI *et al.*, 2014)

O tratamento com antioxidantes tem sido uma forma relevante de prevenir ou minimizar as complicações geradas pelo diabetes. Dentre os antioxidantes amplamente utilizados, destacam-se os flavonoides, pois são capazes de inibir a formação de EROs, eliminar as espécies reativas excedentes, e aumentar ou proteger as fontes de defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Além disso, o efeito hipoglicemiante causado por algumas plantas medicinais pode por si só ser capaz de melhorar o perfil antioxidante ou diminuir a produção de espécies reativas (TRIPATHI & CHANDRA, 2010).

Nesse contexto, recentes estudos têm demonstrado que o maior consumo de vegetais e frutas pode diminuir o risco de desenvolvimento do diabetes, sugerindo que existe uma sinergia entre os antioxidantes da dieta (FORD *et al.*, 2001, COLDITZ *et al.*, 1992). A este respeito, plantas medicinais, como *Morus nigra*, vulgarmente conhecida como a amora, são amplamente utilizados em muitos países, e quase todas as partes da planta têm atividades farmacológicas (PAWLOWSKA *et al.*, 2008, SINGAB *et al.*, 2005). Vários metabólitos biologicamente ativos têm sido isolados e identificados a partir de diferentes espécies de *Morus* (HAN *et al.*, 2007). Além disso, estudos têm revelado que os frutos e folhas de plantas

Araujo, C.M.

deste gênero contêm muitos componentes bioativos, tais como alcalóides, antocianinas, carotenoide e flavonoides, (HASSIMOTTO *et al.*, 2007). No entanto, sabe-se que a composição química de *Morus nigra* pode ser influenciada por diversos fatores, tais como as condições climáticas, a qualidade do solo e o sistema de cultivo empregado (convencional ou orgânico) (IMRAN *et al.*, 2010).

Neste estudo, realizou-se a identificação de flavonoides presentes na polpa e no extrato das folhas de *Morus nigra* através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de ultravioleta e espectrometria de massas. Inicialmente foram observados os comprimentos de onda de absorção das substâncias eluídas; esses espectros no ultravioleta apresentaram-se característicos de agliconas flavonóidicas, como a quercetina e cianidinas, que posteriormente foram confirmados com os dados da fragmentação obtidos na espectrometria de massas. Neste sentido, comparando-se com dados da literatura, na polpa de amora puderam ser identificados as seguintes substâncias: *Cianidina 3-O-glicosídeo*; *Cianidina 3-O-glicosil-ramnoside*; *Quercetina 3-O-glicosídeo / Quercetina 7-O-glicosídeo*; *Quercetina 7-O-glicosídeo / Quercetina 3-O-glicosídeo*. No extrato das folhas de amoreira, novamente analisando os espectros de ultravioleta e de massas, além dos flavonoides (*Luteolina-7-O-gentiobiosideo*; *6-Hidroxi-luteolina-7-O-rutenosideo*; *Quercetina-3-O-furanosil-2''-ramnosil*), foram observados ácidos cafeoilquínicos (*Ácido 3-O-cafeoilquínico*; *Ácido 4-O-cafeoilquínico*; *Ácido 5-O-cafeoilquínico*) que contêm um grupo hidroxila fenólico na sua estrutura, o qual é capaz de estabilizar radicais livres, aumentando assim o potencial antioxidante do extrato. O ácido cafeoilquínico possui atividade antioxidante semelhante a outros ácidos fenólicos, eficiente no sequestro de radicais livres e como quelante de íons metálicos (PRAKASH *et al.*, 2007). Algumas propriedades terapêuticas do ácido cafeoilquínico estão relacionadas ao seu efeito anti-inflamatório, como inibidor da xantina-oxidase, modulador do estresse oxidativo induzido por peróxido, atenuador da oxidação do colesterol LDL e efeito hipotensor em ratos (IRAZ *et al.*, 2005; MAURICIO, 2006). Em posse desses resultados, podemos observar que os perfis químicos dos extratos analisados foram diferentes em suas composições, o que poderia explicar os efeitos biológicos diferenciados observados em ratos diabéticos tratados com a polpa e o extrato das folhas de amoreira.

Além disso, uma maior quantidade de compostos fenólicos foi observada no extrato das folhas em comparação com a polpa de amora (figura 8 – painel A), o que demonstra que os constituintes dos extratos diferiram tanto quantitativa como qualitativamente. Provavelmente foram encontrados mais fenólicos no extrato das folhas do que na polpa

porque a polpa foi simplesmente esmagada e filtrada, já o extrato das folhas, apesar de ser ressuspensionado em água, foi preparado por extração hidroalcoólica, contendo compostos polares e apolares.

Em seguida, determinamos a capacidade antioxidante da polpa e do extrato das folhas de amoreira em neutralizar o radical DPPH. Este é um radical estável que, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio, pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina. Essa redução é acompanhada em comprimentos de onda de 517 a 520 nm pela diminuição da absorvância, uma vez que ocorre uma mudança na coloração violeta (característica do radical) para amarela enquanto a reação se processa. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (HIRATA, 2004). Podemos observar através da figura 8B que tanto a polpa quanto a folha da amora apresentam atividade antioxidante, especialmente nas amostras menos diluídas. Entretanto, vale ressaltar que a capacidade antioxidante do extrato das folhas foi superior à da polpa de amora, este fato pode, possivelmente, ser explicado pelo fato do extrato de folhas possuir uma maior quantidade de compostos fenólicos, como observado nos resultados da figura 8A.

A indução do diabetes foi feita com aloxano, uma das principais drogas utilizadas para indução de diabetes experimental e um dos métodos mais reprodutíveis. (ETUK, 2010) O aloxano é um composto bastante instável rapidamente reduzido ao seu produto tóxico, o ácido dialúrico. Este subproduto estabelece um ciclo redox com formação de radicais superóxido, que são dismutados a peróxido de hidrogênio e posteriormente são formadas espécies altamente reativas pela reação de fenton, os radicais hidroxila. A ação das espécies reativas de oxigênio com um aumento significativo na concentração de cálcio citosólico causa rápida destruição das células β -pancreáticas (SZKULDELSKI, 2001), sendo um fármaco eficiente para reproduzir as características bioquímicas do diabetes tipo 1: hipoinsulinemia associada à condição de hiperglicemia. Neste sentido, os animais do grupo diabético apresentaram uma hiperglicemia quando comparados aos animais do grupo controle (figura 9A), como já era esperado. Em relação à polpa, não foi observada nenhuma diferença em relação ao grupo diabético. Entretanto, este trabalho mostrou que houve atividade antidiabética do extrato da folha de *Morus nigra*, quando administrada por via oral a ratos diabéticos, reduzindo a hiperglicemia induzida pela doença. Isto pode ser atribuído aos componentes fitoquímicos (PATEL & MISHRA, 2011) encontrados no extrato de folhas, como os ácidos cafeoilquínicos. Os ácidos cafeoilquínicos são compostos fenólicos com atividade

antidiabética promissora (WU *et al.*, 2013), e que têm mostrado ser um potente inibidor da atividade da enzima α -glicosidase (NURUL *et al.*, 2013), contribuindo, assim, para a normalização da glicemia. Observamos também em nossos resultados que o tratamento dos ratos diabéticos com o extrato das folhas de *Morus nigra* resultou em um aumento da insulina em comparação com os ratos não tratados (figura 9B), corroborando com os resultados de ODY *et al.*, 2000, Naderi *et al.*, 2004 que mostraram que as folhas de amoreira preta foram utilizadas para estimular a produção de insulina no tratamento de diabetes. NAZARINI *et al.*, 2013, ao avaliar outra espécie do gênero *Morus*, demonstraram que o extrato das folhas de *Morus alba* foi capaz de diminuir a glicemia e aumentar as concentrações séricas de insulina em ratos diabéticos em comparação com os animais do grupo controle.

Conforme apresentado na tabela 1, as ratas diabéticas mostraram uma redução significativa dos pesos finais em comparação aos animais do grupo controle. A perda de peso no animal diabético é uma característica associada à condição patológica, devido a um aumento do catabolismo muscular (RAVI *et al.*, 2004). No entanto, o tratamento com o extrato de folhas e polpa não foi eficiente em restabelecer o peso corporal dos animais diabéticos, provavelmente pelo fato de que 30 dias de tratamento não foi tempo suficiente para causar uma alteração positiva no peso destes animais.

Sabe-se que o diabetes normalmente está associado com alterações no perfil lipídico (WU *et al.*, 2013), em nosso estudo observamos um aumento de 55% na concentração de TAG nos animais diabéticos em comparação com os animais do grupo controle. Nossos resultados mostraram que o tratamento com extrato das folhas causou uma diminuição na concentração sérica de TAG em 23% em relação ao grupo diabético (figura 10A). VOLPATO *et al.*, 2011, observaram uma redução de 50% na concentração de TAG em ratas diabéticas grávidas tratadas com extrato das folhas de *Morus nigra*. A maior redução na concentração de TAG observada no estudo de VOLPATO pode ser devido à dose utilizada no tratamento, já que nesse estudo foi utilizado uma concentração de 400 mg/kg e em nosso estudo foi utilizado uma dose de 150 mg/kg do extrato de folhas de *Morus nigra*. Outro ponto importante que deve ser considerado no estudo de VOLPATO *et al.*, 2011, é que o tratamento com o extrato de folhas foi realizado em ratas diabéticas grávidas, as quais sofrem alterações metabólicas distintas em relação às ratas diabéticas não grávidas. No que diz respeito às concentrações de colesterol total (figura 10A), os animais diabéticos mostraram uma diminuição do mesmo, entretanto pela análise dos resultados observados na figura 10B esta redução pode estar associada à redução da fração HDL, uma vez que não houve mudanças significativas na

concentração da fração aterogênica (figura 11B). O tratamento com a polpa de amora e extrato das folhas não foi capaz de alterar este perfil. SHARMA *et al.*, 2010 observaram efeitos benéficos do tratamento com extrato de folhas da amoreira sobre o metabolismo lipídico em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, entretanto neste estudo foi utilizado outra espécie do gênero *Morus* (*Morus rubra*). Levando em conta que espécies diferentes de *Morus* irão apresentar compostos químicos distintos e, conseqüentemente, efeitos biológicos também diferentes, seria de grande importância de que os trabalhos publicados com plantas medicinais também apresentassem a sua caracterização química, entretanto, isto não ocorre na maioria das vezes, dificultando a discussão de diferentes resultados observados na literatura. Este fato torna evidente a necessidade da caracterização dos extratos antes da validação de seus efeitos biológicos, como realizado em nosso estudo.

Em relação à função hepática (figura 12), o aumento da atividade das enzimas hepáticas ALT e AST nos animais diabéticos pode ser devido a uma resposta ao aloxano, onde há liberação das enzimas pelo fígado com conseqüente migração para a corrente sanguínea (STANLEY *et al.*, 2000), vale ressaltar que apenas o tratamento com o extrato das folhas foi eficiente em reduzir as concentrações de AST e ALT em ratos diabéticos, sendo que AST foi estatisticamente igual ao grupo controle, sugerindo que o extrato de folhas é mais eficaz do que a polpa de amora para proteger o fígado de danos induzidos pela doença. Em relação à função renal, foram quantificados as concentrações de creatinina (figura 13A) e uréia (figura 13B). No grupo de animais diabéticos, as concentrações de uréia foram significativamente mais altas em relação aos animais do grupo controle, o que corrobora com o relatado por NOLASCO *et al.*, 2015, confirmando uma característica bioquímica do diabetes tipo 1 no que tange à maior degradação protéica e, conseqüentemente, a uma maior liberação de uréia. Já os animais diabéticos que receberam os tratamentos mostraram-se com menores concentrações de ureia em relação ao grupo diabético sem tratamento, corroborando com CAO *et al.*, 2015, que observaram efeito protetor nos rins de ratos com DM tipo 1 tratados com um extrato da planta *Urtica dentata*, sugerindo a capacidade de diferentes plantas medicinais na regulação da uréia sérica. Em relação à creatinina não observamos diferenças significativas em nenhum dos grupos avaliados. Sabe-se que os três determinantes da concentração de creatinina no soro (produção, volume de distribuição e eliminação renal) flutuam (MORAN *et al.*, 1985), determinando um atraso na diminuição ou elevação das concentrações de creatinina. Assim, alguns estudos já demonstraram que elevações da uréia podem ocorrer independentemente das concentrações séricas de creatinina (SCHRIER, 2008). Neste sentido, MI *et al.*, 2015 também não encontraram diferença significativa nas

concentrações de creatinina no soro de animais diabéticos, o que se assemelha aos nossos resultados.

As principais mudanças estruturais em proteínas podem ser caracterizadas pelas dosagens de proteína carbonilada (PC), pela perda de grupos tióis e por produtos de oxidação proteica avançada. O uso da PC como marcador de dano oxidativo possui algumas vantagens em relação a outros marcadores, por possuir uma formação relativamente rápida, grande estabilidade e longo tempo de vida (CHEVION *et al.*, 2000). A formação desses compostos carbonilados pode contribuir para o agravamento das complicações diabéticas (ALTOMARE *et al.*, 1997). Altas concentrações de PC foram detectados tanto em pacientes com DM tipo 1 quanto tipo 2 e também em diabetes experimental (DOMINGUEZ *et al.*, 1998; . CAKATAY *et al.*, 2000; TELCI *et al.*, 2000; JANG *et al.*, 2000; CEDERBERG *et al.*, 2001). Em nosso estudo, os animais diabéticos mostraram um aumento na concentração de PC corroborando com (ÁVILA *et al.*, 2013) que mostrou que a concentração de PC é significativamente maior em ratos diabéticos, já nos animais tratados com o extrato das folhas houve uma redução de 40% da PC e nos animais tratados com a polpa de amora as concentrações de PC diminuíram 48%, com isso podemos inferir que os tratamentos foram eficientes em diminuir o dano oxidativo proteico. VOLPATO *et al.*, 2011 também verificaram uma redução na concentração de malonaldeído, um marcador de peroxidação lipídica, em ratas diabéticas grávidas tratadas com extrato das folhas de *Morus nigra*

Dentre os componentes enzimáticos do sistema de defesa antioxidante encontram-se as enzimas SOD, catalase, GPx e o sistema que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) na forma reduzida como um cofator importante da enzima glutathione redutase (GR) e promove a regeneração de moléculas de glutathione oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (EBERHARDT, 2001). Segundo UMAMAHESWARI *et al.*, 2009, SOD, CAT, GSH e GPx são as principais enzimas do sistema de defesa antioxidante do corpo que protegem a membrana celular e outros constituintes celulares contra lesões oxidativas por espécies reativas.

Os nossos resultados mostraram um aumento na atividade da SOD (figura 14A) e uma diminuição na atividade de CAT (figura 14B) em ratos diabéticos. SOD é uma das enzimas mais importantes do sistema de defesa antioxidante, catalisa a dismutação de radicais superóxido para produzir H₂O₂, ONOO e oxigênio molecular (ASHOUR *et al.* 1999). No entanto, alguns estudos sugerem que a super expressão de SOD é de fato prejudicial para as células (GARDNER, *et al.*, 2002). Um aumento na atividade da SOD acompanhada por uma

diminuição na atividade de catalase tem sido associado com concentrações elevadas de H_2O_2 , aumento do dano oxidativo e, conseqüentemente, a formação de radical hidroxila (DE HAAN *et al.*, 1996). Neste sentido, nossos resultados mostraram um aumento na razão SOD/CAT, o que implicaria em um aumento de H_2O_2 e, conseqüentemente do dano oxidativo, o que pôde ser observado indiretamente, em nosso estudo, pelo aumento nas concentrações de PC no grupo de animais diabéticos. O aumento da razão SOD/CAT em animais diabéticos também foi observado por ÁVILA *et al.*, 2013. Ambos os tratamentos (polpa e extrato das folhas) restauraram eficazmente a razão SOD/CAT nos ratos diabéticos, reduzindo a atividade de SOD e aumentando a atividade de CAT. VOLPATO *et al.*, 2011 observaram um aumento na atividade de SOD em ratas diabéticas grávidas e o tratamento com extrato de folhas de *Morus nigra* reduziu a atividade desta enzima.

Estes resultados, se analisados em conjunto, nos sugerem que ambos os tratamentos foram eficientes em diminuir o estresse oxidativo, como observado pela diminuição na atividade de SOD e aumento da CAT, os quais contribuem para a diminuição das concentrações de peróxido de hidrogênio, conduzindo a uma diminuição do dano oxidativo em proteínas, que pôde ser observado pela diminuição das concentrações de proteína carbonilada. Entretanto, para confirmar esta hipótese mais experimentos seriam necessários.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) que exerce papel central na defesa antioxidante (Sen e Hanninen, 1994; Meister, 1995), destacando-se sua função como cofator da enzima glutathiona peroxidase (GPx), onde desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, sendo que sua oxidação gera a glutathiona dissulfeto (GSSG) em sua forma oxidada. A síntese da glutathiona ocorre principalmente no fígado (JEFFERIES *et al.*, 2003). A glutathiona reduzida detoxifica espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos diretamente ou através da catálise enzimática de GPx. As concentrações de glutathiona reduzida e oxidada são mantidos pela atividade das enzimas glutathiona redutase e glutathiona peroxidase. Quando em excesso, a glutathiona oxidada é transportada para fora da célula para que seja mantida a homeostase, entretanto, quando acumulada no interior da célula, a glutathiona oxidada gera estresse oxidativo e vários componentes celulares tornam-se vulneráveis aos danos induzidos pelas espécies reativas, especialmente membranas lipídicas, proteínas e DNA (SHAJEELA *et al.*, 2012, HUBER & ALMEIDA, 2008). A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (dependente de NADPH), que serve para manter os estoques de glutathiona intracelular num estado redox favorável (MANNERVIK & NIELSON, 1988; ATALAY & LAAKSONEN, 2002).

Em nossos resultados não houve alteração no conteúdo de glutathiona total (figura 15) entre nenhum dos grupos avaliados, segundo THORNALLEY *et al.*, (1996) para que haja diferença na via das glutathionas, os tratamentos em geral deveriam ter duração de pelo menos seis meses. No grupo diabético apesar de não haver diferença no conteúdo de glutathiona total, observamos uma diminuição da relação GSH/GSSG. Segundo De MATTIA *et al.*, 1994; JAIN & MCVIE, 1994, indivíduos diabéticos apresentam um aumento de GSSG e uma diminuição de GSH, sugerindo que o estresse oxidativo gerado pelo DM seja responsável pelo consumo da glutathiona na forma reduzida sem alterar seu conteúdo total (ATALAY & LAAKSONEN, 2002). Em relação aos grupos diabéticos tratados não observamos mudanças no conteúdo de glutathiona total, corroborando com os resultados encontrados por OLIVEIRA *et al.*, 2015, que observou que as concentrações de glutathiona total e suas frações em ratos diabéticos tratados com chá branco, que também apresenta alto conteúdo de compostos fenólicos como em nossos extratos de *Morus nigra*, não mostrou diferença quando comparados aos animais controle e aos animais diabéticos.

O nosso estudo não mostrou modificação na atividade das enzimas GPx (figura 16A) e GR (figura 16B). Esses resultados concordam com OYENIHI *et al.*, 2015, os quais verificaram que as concentrações de GPx em animais diabéticos tipo 1 eram iguais às concentrações do controle e seus tratamentos. Vale ressaltar que muitos trabalhos mostram variações nas atividades dessas enzimas antioxidantes em ratos diabéticos, embora tenham sido também relatadas reduções da atividade, alguns estudos também demonstraram um aumento ou até mesmo nenhuma alteração na atividade de GPx e GR. As possíveis razões para a divergência dos resultados observados na literatura são a variação na gravidade da doença, duração do tratamento, especificidade do tecido e variações nas condições experimentais (ESSANI *et al.*, 1996).

No que tange ao *status redox* hepático, nossos resultados se analisados concomitantemente, nos permite sugerir que os animais diabéticos sem tratamento apresentaram elevada concentração de H₂O₂ hepático, visto que a elevada atividade da SOD faz com que haja grande produção desta ERO, e a baixa atividade da catalase e inalteração da atividade de GPx impede que o H₂O₂ gerado seja neutralizado. Contudo em nosso estudo, nos animais tratados verificamos apenas uma diminuição da atividade de SOD e um aumento da atividade de CAT, sem modificações nas concentrações de GPx e GR, o que nos leva a crer que o tratamento tanto com a polpa quanto com o extrato das folhas não influencia a via das glutathionas. Sendo assim, podemos inferir que a polpa e a folha de amoreira foram capazes de

Araujo, C.M.

restaurar o equilíbrio redox através da modulação de SOD e CAT em um mecanismo independente da via das glutatonas, diminuindo o estresse oxidativo nesses animais nas condições experimentais testadas, ou seja, diabetes induzido por aloxana e trinta dias de tratamento oral.

No que diz respeito à parte histológica (figura 18), não houve diferença entre os grupos avaliados, todos possuem aspecto normal semelhante aos animais do grupo controle. GIRIBABU *et al.*, 2014 mostrou que os animais diabéticos apresentaram necrose e hemorragia. Entretanto, em nosso estudo podemos sugerir que o DM causou variações bioquímicas detectáveis sem causar danos estruturais, provavelmente o tempo de experimentação não tenha sido suficiente para causar modificações estruturais no tecido hepático, passíveis de visualização pela técnica de H&E.

As metaloproteinases de matriz (MMP) estão associadas a processos inflamatórios (BENEDEK *et al.*, 2007) e são superexpressas no diabetes (HAYDEN *et al.*, 2005; YARAS *et al.*, 2008). Alguns produtos naturais têm sido descritos como inibidores de MMP (JIN *et al.*, 2005; SEO *et al.*, 2005). Os nossos resultados mostraram que o extrato das folhas foi eficaz na diminuição da expressão e da atividade de MMP-2. Estes resultados podem ser explicados pela presença de ácidos cafeoilquínicos que têm atividades inibidoras de MMP (BENEDEK *et al.*, 2007), e esses ácidos segundo CHAO *et al.*, 2009 aumentam as concentrações de insulina por consequência causam a diminuição das concentrações séricas de glicose e, segundo ZHENG *et al.*, 2015 as altas concentrações de glicose causam a elevação das concentrações de MMP-2, explicando assim as altas concentrações de MMP-2 nos animais diabéticos e nos animais tratados com a polpa em relação aos animais do grupo controle. Já na MMP-9 não observamos mudanças significativas em suas concentrações no fígado, ZHONG *et al.*, 2014 mostraram que a MMP-9 tem uma maior atividade em animais diabéticos, mas sua expressão elevada pode ser observada principalmente no rim. Provavelmente altas concentrações de MMP-9 seriam observadas no rim dos animais diabéticos, mas seriam necessários mais ensaios para comprovar esta hipótese.

Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que o extrato das folhas de *Morus nigra* melhora a resposta glicêmica, o perfil antioxidante e o dano oxidativo em ratos com diabetes tipo 1 (figura 21), sendo um alvo terapêutico interessante para a continuidade de estudos futuros.

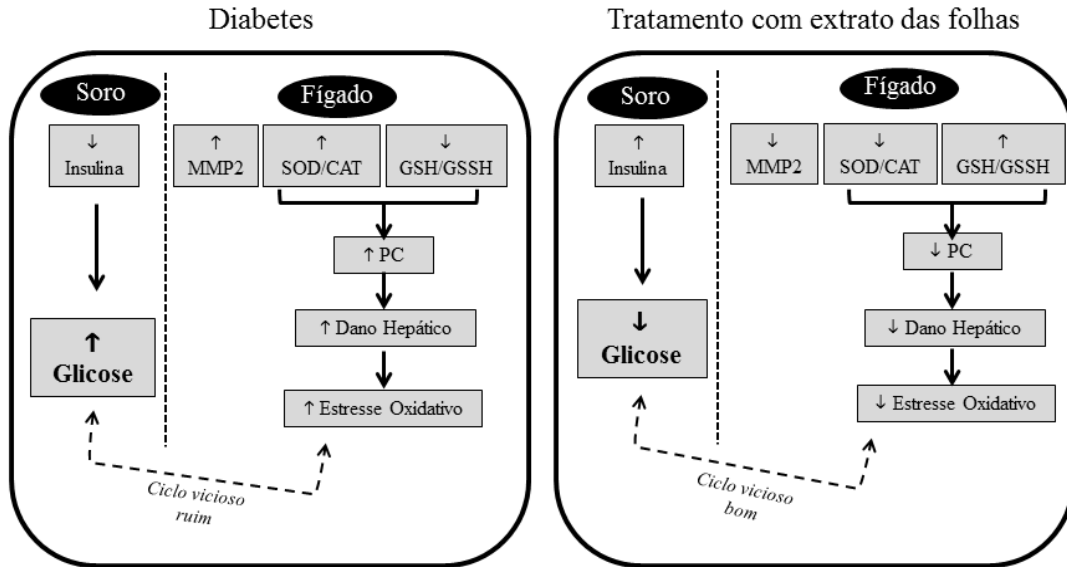


Figura 21: Proposta para o efeito antioxidante do extrato de folha de *Morus nigra* MMP: metaloproteinases da matriz, SOD/CAT: razão superóxido dismutase/catalase, GSH/GSSG: razão glutathiona reduzida/glutathiona oxidada, PC: proteína carbonilada. (↑) aumentou; (↓) diminuiu. O estresse oxidativo induz hiperglicemia e a hiperglicemia sustenta o estresse oxidativo, aumentando o dano oxidativo (círculo vicioso ruim). Já o tratamento com extrato das folhas diminui a hiperglicemia e o estresse oxidativo, evitando o processo de glicotoxicidade (ciclo vicioso bom).

Tabela 4: Avaliação da eficácia do tratamento com a polpa e extrato das folhas de amoreira.

PARÂMETRO ANALISADO	POLPA	FOLHA
Compostos químicos	Cianidina 3-O-glicosídeo; Cianidina 3-O-glicosil-ramnosídeo; Quercetina 3-O-glicosídeo/ Quercetina 7-O-glicosídeo; Quercetina 7-O-glicosídeo/ Quercetina 3-O-glicosídeo	Ácido 3-O-cafeoilquínico; Ácido 4-O-cafeoilquínico; Ácido 5-O-cafeoilquínico; Luteolina-7-O-gentiobiosídeo; 6-Hidroxi-luteolina-7-O-rutenosídeo; Quercetina-3-O-furanosil-2''-ramnosil
Concentração de fenólicos	<	>
Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	<	>
Glicemia	—	↓
Insulinemia	—	↑
Perfil lipídico	—	—
Atividade ALT/AST	—	↓
Concentração de uréia	—	↓
Razão SOD/CAT	↓	↓
Metabolismo da glutatona	—	—
MMP-2	—	↓
MMP-9	—	—

(<) menor do que na folha, (>) maior do que na polpa, comparação feita entre os extratos. (↑) aumentou; (↓) diminuiu em comparação aos ratos diabéticos.

CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

Conclui-se, a partir dos resultados obtidos neste estudo, que o extrato das folhas parece ser mais eficiente em promover uma melhora no controle glicêmico e insulínico em ratas diabéticas tipo 1. Já a polpa e o extrato das folhas foram eficientes em restaurar a razão SOD/CAT e diminuir as concentrações de proteína carbonilada aas concentrações do controle. Apenas o tratamento com o extrato das folhas foi eficaz em diminuir a expressão e atividade de MMP-2. Portanto, o tratamento com as folhas de *Morus nigra* seria uma boa alternativa para minimizar as complicações induzidas pelo diabetes. Entretanto, mais estudos são necessários para a validação do seu uso no diabetes.

CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION) (2014). *Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care* **37**: 14-80. DOI: 10.2337/dc14-S014.

AEBI H. (1984). *Catalase in vitro. Methods Enzymology* **105**: 106-121.

ALFRADIQUE M. E., BONOLO P. F., DOURADO I. COSTA M. F. L., MACINKO J., MEDONÇA C. S., OLIVEIRA V. B., SAMPAIO L. F. R., SIMONI C., TURCI M. A. (2009). *Interações por condições sensíveis à atenção primária: a construção da lista brasileira como ferramenta para medir o desempenho do sistema de saúde. Cadernos de saúde Pública* **25**. Rio de Janeiro. pp 1337 - 1349.

ALMEIDA J. R. G. S., SOUZA G. R., ARAUJO E. C. C., SILVA F. S., LIMA J. T., RIBEIRO L. A. A., NUNES X. P., FILHO J. M. B., JUNIOR L. J. Q. AND SANTOS M. R. V. (2012). *Medicinal Plants and Natural Compounds from the Genus Morus (Moraceae) with Hypoglycemic Activity: A Review. Intech* **11**: 189 - 206.

ALTOMARE, E., VENDEMIALE, G., CHICCO, D., PROCACCI, V., AND CIRELLI, F. (1992). Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabetes & Metabolism* **18**, 264-271.

AMES B. N. (1993). *Dietary Carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science* **221**: 1256-1264.

ANDALLU B., SURYAKANTHAM V., LAKSHMI SRIKANTHI B., REDDY G. K. (2001). *Effect of mulberry (Morusindica L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes. ClinicaChimicaActa* **314**:47-53.

ARFAN M., KHAN R., RYBARCZYC A., ANAROWICZ R. (2012). *Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. Int. J. Mol. Sci* **13**: 2472-2480.

ARUOMA O. I., HALLIWELL B., GAJEWSKI E., DIZDAROGLU M. (1989). *Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. J. Biol. Chem* **264**: 509-512.

ASHOUR M, SALEM S, HASSANEEN H, EL-GADBAN H, ELWAN N, AWAD A, et al. Antioxidant status in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM). *J Clin Biochem Nutr* 1999;26:99-107.

AVILA, D. L; ARAUJO, G. R .; MIRANDA, P. *et al.* (2013) Vildagliptin Ameliorates Oxidative Stress and Pancreatic Beta Cell Destruction in Type 1 Diabetic Rats. *Archives of Medical Research*, v. 44, p. 194-202.

BANTING F. G., BEST C. H., COLLIP J. B., CAMPBELL W. R., FLETCHER A. A., MACLEOD J. J. R., NOBLE E. C. (1922). *The effect produced on diabetes by extracts of pancreas. Trans. Assoc. Am. Physicians* **37**: 337-347.

BASH N., KOVSAN J., OVADIA H., RUDICH A. (2009). *Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. Physiol. Rev.* **89**: 27-71.

Araujo, C.M.

BENEDEK B1, KOPP B, MELZIG MF. ACHILLEA MILLEFOLIUM L. (2007) s.l. is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *J Ethnopharmacol.* Sep 5;113(2):312-7. Epub 2007 Jul 3.

BLOOMGARDEN Z. T. (2006). *Development in diabetes and insulin resistance.* *Diabetes Care* **29**: 161:167.

BONNEFONT-ROUSSELOT D., BASTARD J. P., JAUDON M. C., DELATTRE J. (2000). *Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance.* *Diabetes Metab.* **26**: 163-176.

BOUDERBALA S., PROST J., LACAILLE-DUBOIS M. A., BOUCHENAK M. (2010). *Iridoid extracts from ajugaiva increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet.* *Nutr. Res.* **30**: 358-365.

BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E., BERSET C. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity L. W. T. Food Science and Technology* **28**: 25-30.

BROWNLEE M. (2001). *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.* *Nature* **414**: 813-820.

BYUN J. Y. (2009). *Reactive oxygen species-dependent activation of Bax and poly (ADP-ribose) polymerase-1 is required for mitochondrial cell death induced by triterpenoid pristimerin in human cervical cancer cells.* *mol. Pharmacol* **76**: 734-744.

CAI H., HARRISON D. G. (2000) *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases - The role oxidant stress.* *Cir Res* **87**.

CAO H., JI Y., LI Y., FU R., XIANG M. (2015). *Protective Effects of the Total Coumarin Fraction of Urtica dentata on Experimental Nephropathy in vitro and in vivo.* *Planta Med* Sep 14 [Epub ahead of print]

CAKATAY U., TELCI A., SALMAN S., SATMAN L., AND SIVAS A. (2000). *Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications.* *Endocrine Research* **26**, 365-379.

CARVALHEIRA J. B. C., ZECCHIN H. G., SAAD M. J. (2002). *Vias de Sinalização da Insulina.* *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* **46**: 419-425.

CAWSTON T. E., WILSON A. J. (2006). *Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease.* *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*: **20**: 983-1002.

CEDERBERG, J., BASU, S., AND ERIKSSON, U.J. (2001). *Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy.* *Diabetologia* **44**, 766-774.

CERNEA S., DOBREANU M. (2013). *Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications.* *Biochemical Medicine* **23**: 80-266.

Araujo, C.M.

CHAO P. C., HSU C. C., YIN M. C. (2009). *Anti inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. Nutrition & Metabolism* pp:6-33.

CHENG W.; FU Y. X.; PORRES J. M.; ROSS D. A.; LEI X. G. (1999) *Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. FASEB J.* **13**: 1467-75.

CHEVION, M., BERENSHTEIN, E., AND STADTMAN, E.R. (2000) *Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. FreeRadical Research* **33 Suppl**, S99-108.

CHICHIOCO-HERNANDEZ C., WUDARSKI J., GEVAERT L., VERSCHAEVE L. (2011). *Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of some Philippine medicinal plants. Pharmacogn* **7**: 171-175.

CHOI J., KANG H. J., KIM S. Z., KWON T. O., JEONG S. I., JAMG S. I. (2013). *Antioxidant effect of astragalín isolated from the leaves of M. alba L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. Arch. Pharmacol Res.* **39**: 912-917.

CHUNG H. I., KIM J., KIM J. Y., KWON O. (2013). *Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: randomized double-blind placebo controlled pilot study. J. Funct. Foods* **5**: 1502-1506.

COLDITZ, G. A., MANSON, J. E., STAMPFER, M. J., ROSNER, B., WILLETT, W. C., SPEIZER, F. E. Diet and risk of clinical diabetes in women. *Am J Clin Nutr* **55**, 1018 –1023, 1992.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.(1991). *Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.* São Paulo, Cobeá.

CONTRAN R. S., KUMAR V., COLLINS T. (2000). *Patologia Estrutural e Funcional.* Guanabara Koogan.

COOPAN R. (2005). *General approach to the treatment of diabetes mellitus. In: Kahn.*

COSTA M. P., MAGALHÃES N. S. S., GOMES F. E. S., MACIEL M. A. M. (2007). *A review of the biologic activities of trans-dehydrocrotonin, a natural product obtained from Croton cajucara. Brazilian Journal of Pharmacognosy* **17**: 275 – 286.

D'ANGELO S., MORANA A., SALVATORE A., ZAPPÀ V., GALLETTI P. (2009). *Protective Effect of Polyphenols from Glycyrrhizaglabra Against Oxidative Stress in Caco-2 Cells. J. Med. Food.* **12**:1326-1333.

DAT N. T., BINH P. T. X., QUYNH L. T. P., NINH C. V., HOUNG H. T., LEE J. J. (2010). *Cytotoxic prenylated flavonoids from M. alba. Fitoterapia* **81**:1224-1227.

DE HAAN, J.B.; CRISTIANO, F.; IANNELLO, R.; BLADIER, C.; KELNER, M.J.; KOLA, I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity

Araujo, C.M.

induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum. Mol. Genet.* 1996; 5: 283-292.

DEEPA M., SURESHKUMAR T., SATHEESHKUMAR P. K., PRIYA S. (2013). *Antioxidant Rich Morus Alba leaf Extract induces Apoptosis in Human Colon and Breast Cancer Cells by Downregulation of Nitric Oxide Produced by Inducible Nitric Oxide Synthase.* *Nutr. Cancer* **65**: 305-310.

DIAS A. S., LLESUY S., MARRONI C. A., MARRONI N. (2004). Gastrointestinal alterations in diabetes mellitus: oxidative stress and blood flow in the superior mesenteric artery - experimental study. *Arq. Gastroenterol* **41**. DOI: 10.1590.

DÍAZ-FLORES M., BAIZA-GUTMAN L. A., IBÁÑEZ-HERMANÁNDEZ M. A., PASCOE-LIRAD D., GUZMÁN-GREENFEL A. M., KUMATE-RODRÍGUEZ J. (2004). *Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica.* *Gaceta Médica México* **140**: 437-448.

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

DORNAS W. C., OLIVEIRA T. T., DORES R. G. R., FABRES M. H. A., NAGEM T. J. (2009), *Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais.* *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**: 488-500.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** Disponível em : <<http://www.embrapa.br/search?SearchableText=amora+preta&x=10y=9> . Acesso em: 20 de Outubro de 2014.

ESSANI N. A, MCGUIRE G. M, MANNING A. M, JAESCHKE H. (1996). *Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF-κB in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo.* *J Immunol.* **156**:2956–63.

ETUK, E. U. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J. N. Am.* 1(2): 130-134, 2010.

FORD, E. S., MOKDAD, A. H. Fruit and vegetable consumption and diabetes mellitus incidence among U.S. adults. *Prev Med*, 32, 33–39, 2001.

FRISCHER H., AHMAD T. (1987). *Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency.* *J. Lab. Clin. Med.* **109**: 583-538.

GALIS Z., KHATRI J. (2002). *Matrix Metalloproteinases in Vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.* *Circ Res* **90**:62-251.

GARDNER, R.; SALVADOR, A.; MORADAS-FERREIRA. P. Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? A minimalist explanation. *Free Radic. Biol. Med.* 2002; 32: 1351–1357.

GEORGÉ S, BRAT P, ALTER P, AMIOT MJ. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*:53 1370-3

Araujo, C.M.

GEURTS N., OPDENAKKER G., VAN DEN STEEN P. E. (2012). *Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. Pharmacology & Therapeutics* **133**: 257-279.

GHAJAR C. M., et al. (2008) *Matrix metalloproteinase control of capillary morphogenesis. Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **18**:251-278.

GHARAGOZLIAN S., et al. (2009). *Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. BMC Clin Pathol* **9**: 1-5.

GHARAGOZLIAN S., SVENNEVIG K., BANGSTAD H., WINBERG J., KOLSET S. (2009). *Matrix Metalloproteinases in Subjects with type 1 diabetes. BMC ClinPathol* **9**:7.

GIEBEL S., MENICUCCI G., MCGUIRE P., DAS A. (2005). *Matrix Metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. Lab Invest* **85**:597-607.

GIRIBABU N., KUMAR K. E., REKHA S. S., MUNIANDY S., SALLEH N. (2015). *Vitis vinífera (Muscat variety) Seed Ethanolic Extract preserves Activity Levels of Enzymes and Histology of the liver in adult Male Rats with Diabetes. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. DOI: 10.1155/2015/542026

GONZÁLEZ E. A., AGRASAR A. T., CASTRO L. M. P., FERNÂNDEZ I. O., GUERRA N. P. (2010). *Production and characterization of distilled alcoholic beverages obtained by solid-state fermentation of black mulberry (Morus nigra L.) and black currant (Ribes nigrum L.). J. Agricul. Food. Chem.* **58**: 2529-2535.

GRANCE S. R. M., TEIXEIRA M. A., LEITE R. S., GUIMARÃES E. B., SIQUEIRA J. M., FILIU W. F. O., VASCONSELOS S. B. S., VIEIRA M. C. (2008). *Baccharistriera: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. Journal of Ethnopharmacology* **117**: 28 - 33.

GROSS J. L., NEHME M. (1999). *Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. Revista da Associação Médica Brasileira* **45**, São Paulo.

GROSS J. L., SILVEIRO S. P., CAMARGO J. L., REICHEL T. A. J., AZEVEDO M. J. (2002). *Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arq Bras Endocrinol Metab* **1**: 16-26.

HADDAD J. J., HARB H. L. (2005). *L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? Mol.Immunol.* **42**: 987-1014.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. (2003). *Free radicals in Biology and Medicine*. 3 ed., Oxford University Press, NY, 2003.

HAN WL, LIU L, ZHANG XQ, YE WC, PAN YL, YAO XS. (2007). *Chemical constituents from leaves of Morus multicaulis.* *J Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* **32**: 695–698.

Araujo, C.M.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. (2007). *Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (Morus nigra) growing in Brazil. Food Sci. Technol. Int.* 13, 17–25

HAYDEN MR, SOWERS JR, TYAGI SC (2005) *The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. Cardiovasc Diabetol* 4:9

HALBERG N., WERNSTEDT-ASTERHOLM I., SCHERER P. (2008). *The adipocyte as an endocrine cell. EndocrinolMetabClin Am* 37:753-768.

HENDRICH A. B. (2006). *Flavonoid-membrane interaction: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. ActaPharmacol Sin* 27:27-40.

HIRATA, L. L. *Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum.* Curitiba, 2004, 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

HOPPS E., CAIMI G. (2012). *Matrix Metalloproteinases in metabolic syndrome. Eur J Intern Med* 23: 99-104.

HOSSEINZADEH H., SADEGHI A. (1999). *Antihyperglycemic effects of Morusnigra and Morusalba in mice. Pharmaceutical and Pharmacological Letters* 9: 63-65.

IDF (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION) (2011). *Diabetes Atlas 5th edition.* <http://www.idf.org/media-events/press-releases/2011/diabetes-atlas-5th-edition>. (23-08-2015)

IDF (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION) BIABETES ATLAS GROUP (2015). *Update of mortality attributable to diabetes for the IDF Diabetes Atlas: estimates for the year 2013 (2015).* *Diabetes Research and Clinical Practice*(2015). DOI: 10.1016

IMRAN M, KHAN H, SHAH M, KHAN R, KHAN F. (2010). *Chemical composition and antioxidant activity of certain Morus species. J Zhejiang Univ Sci B.* Dec;11(12):973-80. doi: 10.1631/jzus.B1000173.

IRAZ M., FADILLIOGLU E., TASDEMIR S., ERDOGAN S. (2005). *Role of vagal activity on bradycardic and hypotensive effects of caffeic acid phnethyl ester (CAPE). Cardiovascular Toxicology* 5:391-396.

JACQUEMINET S., BEN ABDESSELAM O., CHAPMAN M., NICOLAY N., FOGLIETTI M., GRIMALDI A., et al. (2006). *Elevated circulating levels of Matrix metalloproteinase-9 in type 1 diabetic patients with and without retinopathy. ClinChimActa* 367:7-103.

JANG, Y.Y., SONG, J.H., SHIN, Y.K., HAN, E.S., AND LEE, C.S. (2000). *Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotoc in-induced diabetic rats. Pharmacological Research* 42, 361-371.

JIN, U.H., LEE, J.Y., KANG, S.K., KIM, J.K., PARK, W.H., KIM, J.G., MOON, S.K., KIM, C.H., 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type of

Araujo, C.M.

strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences* **77**, 2760–2769.

JOHANSEN J. S., HARRIS A. K., RYCHLY D., ERGUL A. (2005) *Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. Cardiovascular Diabetology*. **4**: 1-11.

JORDÃO JR., A. A., CHIARELLO P. G., BERNARDES M. S. M., VANNUCCHI H. (1998) *Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. Medicina, Ribeirão Preto*, **31**, 434-449.

KADOGLOU N., DASKALOPOULOU S., PERREA D., LIAPIS C. (2005). *Matrix Metalloproteinases and diabetic vascular complications. Angiology* **56**: 89-173.

KATSUBE T., IMAWAKA N., KAWANO Y., YAMAKI Y., SHIWAKU K., YAMANE Y. (2010). *Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (M. alba L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. Food Chem.* **97**: 25-31.

KING H., AUBERT R. E., HERMAN W. H. (1998). *Global burden of diabetes. Diabetes Care* **21**: 1414-1431.

KUPAI K., SZUCS G., CSEH S., HAJDU I., CSONKA C., CSONT T., FERDINANDY. (2010). *Matrix Metalloproteinases activity assays: Importance of zymography. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.*

LAI L. S., CHOU S. T., CHAO W. W. (2001). *Studies on the antioxidant activities of Hsiantso (MesonaprocumbensHemsl) leaf gum. J. Agricultural and Food Chemistry* **49**: 963-968.

LEE J. H., FELIPE P., YANG Y. H., KIM M. Y., KWON O. Y., SOK D. E., KIM H. C., KIM M. R. (2009). *Effects of dietary supplementation with red-pigmented leafy lettuce (Lactuca sativa) on lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high-fat high-cholesterol diet. British. J. Nutrition* **101**:1246-1254.

MANICONE A., MCGUIRE J. (2008). *Matrix Metallproteinases as modulators of inflammation. Semin Cell DevBiol* **19**:34-41.

MANNELLO F., MESSA V. (2012). *Nuclear localization of matrix metalloproteinases. Prog. Histochem Cytochem* **47**: 27-58.

MANNERVIK B. AND DANIELSON U. H. (1988). *Glutathione transferases--structure and catalytic activity. CRC. Critical Reviews in Biochemistry* **23**: 283-337.

MARKLUND, S. L., HOLME, E., HELLNER, L. (1982). *Superoxide dismutase in extracellular fluids. Clim Chim Acta.* **126**: 41-51.

MAURÍCIO A. Q. (2006) *Estudo da atividade antioxidante do ácido cafeico e da PIH: um polifenol natural e um quelante sintético. Brasilia :UFB. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química).*

MAYES P. A. (1990). *Biologic oxidation. In Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (eds): Harper's Biochemistry. San Mateo, Appleton& Lange. pp. 105-111.*

Araujo, C.M.

MAZZANTI C. M., SCHOSSLER D. R., FILAPPI A., PRESTES D., BALZ D., MIRON V., MORSCH A., SCHETINGER M. R. C., MORSCH V. M., CECIM M. (2003). *Extrato da casca de Syzyiumcumini no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. Cienc. Rural* **6**: 1061-1065.

MCGARRY J. D., DOBBINS R. L. (1999). *Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. Diabetologia* **42**: 38-128.

MEISTER A. (1995). *Glutathione metabolism. Methods in Enzymology* **251**: 3-7.

MEYDANI M. (1992). *Protective role of dietary vitamin E on oxidative stress in aging* **15**:89-93.

MI N., ZHANG X. J., DING Y., LI G. H., WANG W. D.,XIAN H. X., XU J. (2015). *Branched-chain amino acids attenuate early kidney injury in diabetic rats. Biochemical and Biophysical Research Communications.* XXX 1-7

MICHINORI K., YASUKO I., HIREAKI M., HITOSHI M. (2001). *Anti-diabetic effect of protoplast preparation from fresh leaves of mulberry (Morusalba). Nature Medicine* **55**:181-186.

MIN B. S., et al. (2012) *High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver matastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. Oncology Letters* **4**:123-130.

MURRAY C. J. L., LOPEZ A. D., JAMISON D. T. (1994). *The Global Burden of Disease in 1990: Summary Results, Sensitivity Analysis, and Future Directions. Bulletin of the World Health Organization* **72**:495-509.

MUSTAFA A. AND DAVID E. L. (2002). *Diabetes, oxidative stress and Physical exercise. Journal of Sports and Medicine* **1**: 1-14.

NADERI G. A., ASGARY S., SARRAF-ZADEGAN N., OROOJY H., AFSHIN-NIA F. (2004). *Antioxidant activity of three extracts of Morus nigra Phytotherapy Research* **18**: 365 – 369.

NAUDI, A. et al. (2011). *Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress. Experimental Diabetes Research*: 1-14.

NIKKOLA J., ET AL. (2005). *High Serum Levels of matrix metalloproteinases-9 and matrix metalloproteinases-1 Are associated with Rapid Progression in Patients with Metastatic Melanoma. Clinical Cancer Research* **11**: 5158-5166.

NOGUEIRA-MACHADO, J. A., PURISH, S., MATTOS, R. T., VELOSO, C. A., REIS, J. S. (2008). *Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab*, 52, 1096-1105.

NOLASCO E. L., ZANONI F. L., NUNES F. P., FERREIRA S. S., FREITAS L. A., SILVA M. C., MARTINS J .O. (2015). *Insulin Modulates Liver Function in a Type I Diabetes Rat Model. . Cell Physiol Biochem* 06 de julho; 36 (4): 1467-1479. [Epub ahead of print]

Araujo, C.M.

NURUL ISLAM M, JUNG HA, SOHN HS, KIM HM, CHOI JS. (2013) Potent alpha-glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. *Arch Pharm Res*;36:542–52.

ODY MNIMH P. (2000). *The complete Guide Medicinal Herbal*. 2nd ed. Dorling Kindersley, London.

OH K. S., RYU S. Y., LEE S., SEO H. W., OH B. K., KIM Y. S., LEE B. H. (2009). *Melanin concentrating hormone-1 receptor antagonism and anti-obesity effects of ethanolic extract from M. alba leaves in diet-induced obese mice*. *J. Ethnopharmacol.* **122**:216-220.

OKPASHI VE, BAYIM BP, OBI-ABANG M. *Comparative Effects of Some Medicinal Plants: Anacardium occidentale, Eucalyptus globulus, Psidium guajava, and Xylopi aethiopica Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Male Wistar Albino Rats*. *Biochem Res Int*. 2014;2014:203051. doi: 10.1155/2014/203051. Epub 2014 Nov 27.

OLIVEIRA P.F., TOMÁS G.D., DIAS T.R., MARTINS A.D., RATO L., ALVES M.G., SILVA B.M. (2015). *White tea consumption restores sperm quality in prediabetic rats preventing testicular oxidative stress damage*. *Reproductive BioMedicine Online*. DOI:10.1016/j.rbmo.2015.06.021

OMIDIRAN M. O., BAIYEWU R. A., ADEMOLA I. T., FAFOREDE O. C. (2012). *Phytochemical analysis, nutritional composition and antimicrobial activities of white mulberry (M. alba)*. *Pak. J. Nutr.* **11**: 456-460.

OPDENAKKER G., STEEN P. E. V. D., VAN DAMME J. (2001). *Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions*. *Trends in Immunology* **22**:571-579.

OU T. T., HSU M. J., CHAN K. C., HUANG C. N., HO H. H., WANG C. J. (2011). *Mulberry extract inhibits oleic acid-induced lipid accumulation via reduction of lipogenesis and promotion of hepatic lipid clearance*. *J. Sci. Food Agric.* **91**: 2740-2748.

OYENIHI O.R., BROOKS N.L., OGUNTIBEJU O.O., (2015). *Effects of kolaviron on hepatic oxidative stress in streptozotocin induced diabetes*. *Complementary and Alternative Medicine* **15**:236. DOI: 10.1186/s12906-015-0760-y

PAGE-MCCAW A., et al. (2007). *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling*. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:221-233.

PAWLOWSKA A. M., OLESZEK W., BRACA A. (2008). *Quali-quantitative analyses of flavonoids of Morus nigra L. and Morus alba L. (Moraceae) fruits*. *J. Agric. Food. Chem.* **56**: 3377-3380.

PEETERS S., ENGELEN L., BUIJS J., CHATURVEDI N., FULLER J. H., SCHALKWIJK C. G., STEHOUWER C. D., EURODIAB PROSPECTIVE COMPLICATIONS STUDY GROUP. (2015). *Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study*. *Us National Library of Medicine National Institutes of Health*. DOI: 10.1186/s12933-015-0195-2.

Araujo, C.M.

PENGBO W., YONGLONG H., SHIYUN T., MING L., YONGXIANG S., GUO F. (2015). *Interactions of central obesity with rs3918242 on risk of non-alcoholic fat liver disease: a preliminary case-control study. International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **8**:4165 - 4170.

PERCIVAL M. (1998) *Antioxidants. Clinical Nutrition Insights*. 10.

PETLEVSKI R., HADZIJA M., SLJEPCEVIC M., JURETIC D. (2001). *Effect of "antidiabetics" herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. J. Ethnophar* **75**:181-184.

PIETTA P. G. (2000). *Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Products*. **63**: 1035-1042.

PORTAL DA SAÚDE. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anterioresagencia-saude/3487-> (accessed October 2013)

PRAKASH D., SURI S., UPADHYAY G., SINGH B. N. (2007). *Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition* **58**: 18 - 28.

PRENTKI M., JOLY E., EL-ASSAAD W., RODUIT R. (2002). *Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partoning, and Glucolipotoxity: Role in β -Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes. Diabetes* **51**: 405-413.

PRINCE P. S., MENON V. P., PARI L. (1998). *Hypoglycaemic activity of Syzigiumcumineseeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. J. Ethnophar*. **61**: 1-7.

RAINS, J. L., JAIN, S. K. (2011). *Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. Free Radical Biology and Medicine* **50**: 567 - 575.

RAO A. V., RAO L. G. (2007). *Carotenoids and human health. Pharmac*. **55**: 207-216.

RENARD C. B, KRAMER F., JONHANSSON F., LAMHARZ N., TANNOCK L. R., HERRATH M. G., CHAIT A., BORNFELDT K. E. (2004). *Diabetes and diabetes-associated lipid abnormalities have distinct effects on initiation and progression of atherosclerotic lesions. Journal of Clinical Investigation* **114**: 659-668.

ROBERTSON R. P., HARMON J., POITOUT V. (2004). *β -cell glucode toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. Diabetes* **53**: 119-124.

ROBERTSON R. P., HARMON J., TRAN P. O., TANAKA Y., TAKAHASHI (2003). *H.Glucose toxyty in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. Diabetes* **52**:581-587.

SALES A. L. C. C. (2011). *Efeito de suplementação com aveia, linhaça, gergelim, semente de girassol e jatobá sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus em ratos. Dissertação de mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina.*

SCHRIER R.W. (2008). *Blood urea nitrogen and serum creatinine: not married in heart failure. Circ Heart Fail*. May; **1**(1):2-5. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.770834

Araujo, C.M.

SCHULZ, R. (2007). *Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches*. *Rev. Pharmacol. Toxicol* **47**: 211-242.

SCOTT M. D., LUBIN B. H., ZUO L., KUYPERS F. A. (1991). Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J. Lab. Clin. Med.* **118**: 7-16.

SEN C. K. AND HANNINEN O. (1994). Physiological *antioxidants*. In: *Exercise and oxygen toxicity*. Ed: Sen CK, Packer L and Hanninen O. Amsterdam: Elsevier 89-126.

SEO, U.K., LEE, Y.J., KIM, J.K., CHA, B.Y., KIM, D.W., NAM, K.S., KIM, C.H., 2005. Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. *Journal of Ethnopharmacology* **97**, 101–106.

SHAMI N. J., MOREIRA E. A., (2004). *Lycopene as an antioxidant agent*. *Rev. Nutr.* **17**: 227-236.

SHARMA S.B., GUPTA S., AC R., SINGH U.R., RAJPOOT R., SHUKLA S.K. (2010). *Antidiabetogenic action of Morus rubra L. leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats*. *J Pharm Pharmacol.* Feb;62(2):247-55. doi: 10.1211.jpp/62.02.0013.

SHAW J. E., SICREE R. A., ZIMMET P. Z. (2010). *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **87**: 4-14.

SHAW J. E., ZIMMET P. Z., MCCARTY D., COURTEN M. (2000). *Type 2 diabetes worldwide according to the new classification and criteria*. *Diabetes Care* **23**: 5-9.

SIES H. (1993). *Strategies of antioxidant defense*. *European Journal of Biochemistry.* **215**: 213-219.

SINGAB A. N., EL-BESHBISHY H. A., YONEKAWA M., NOMURA T., FUKAI T. (2005). *Hypoglycemic effect of Egyptian Morus alba root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats*. *J. Ethnophar.* **100**: 333- 338.

SKUPIEN K., KOSTRZEWA-NOWAK D., OSZMIANSKI J., TARASIUK J. (2008). *In Vitro antileukaemic activity of extracts from chokeberry (Aronia melanocarpa [Michx] Elliott) and Mulberry (M. alba L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells*. *Phytother. Res.* **22**: 689-694.

SNELL-BERGEON J., NADEAU K. (2012). *Cardiovascular disease risk in your people with type 1 diabetes*. *J Cardiovasc Transl Res* **5**:62-446.

SNOEK-VAN BEURDEN P. A. M., VON DEN HOFF J. W. (2005). *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. *Biotechniques* **38**: 73-83.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). (2009) *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009*. São Paulo.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). (2013) *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013*. São Paulo.

Araujo, C.M.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-Jr, V. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 30(2): 351-355. 2007.

SPINALE F. (2007). G. *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. Physiological Reviews* **87**: 1285-1342. DOI: 10.1152/physrev.00012.2007.

SPINALE F. G., et al. (2000). *Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. Cardiovascular Research* **46**: 225- 238.

STADLER K., JENEI V., VON B. G., SOMOGYI A., JAKUS J. (2003) *Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. Free Radic.Biol.Med.* **35**: 1240-51.

STANLEY, P.; PRINCE, M.; MENON, V. P. Hypoglycaemic and other related actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 70(1): 9-15, 2000.

SUNG M. M., SCHULZ C. G., WANG W., SAWICKI G., BAUTISTA-LÓPEZ N. L., SCHULZ R. (2007). *Matrix metalloproteinases-2 degrades the cytoskeletal protein α -actinin in peroxynitrite mediated myocardial injury. Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **43**:429-436.

TANG V., WANG J. (2012). *Oxidative Stress in Bipolar Disorder. Biochemistry e Analytical biochemistry*. DOI: 10.4172/2161-1009.

TELICI, A., CAKATAY, U., SALMAN, S., SATMAN, I., AND SIVAS, A. (2000) Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* **50**, 213- 223.

THRAILKILL K., BUNN R., MOREAU C., COCKRELL G., SIMPSON P., COLEMAN H., et al. (2007). *Matrix Metalloproteinase-2 dysregulation in type 1 diabetes. Diabetes Care* **30**:6-2321.

TRIPATHI, U. N.; CHANDRA, D. *Anti-hyperglycemic and anti-oxidative effect of aqueous extract of Momordica charantia pulp and Trigonella foenum graecum seed in alloxan-induced diabetic rats. Indian Journal of Biochemistry e Biophysics.* 47: 227-233, 2010.

TSUDUKI T., KIKUCHI I., KIMURA T., NAKAGAWA K., MIYAZAWA T. (2013). *Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. Food Chem.* **139**: 16-23.

URSELL, A.(2000). *The Complete Guide Healing Foods*. DorlingKindersley, London.

VERNILLO A. T. (2001). *Diabetes Mellitus: Relevanceto dental treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadioEndod* **91**: 70-263.

Araujo, C.M.

VINCENT A. M. (2004). *Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy*. *Endocrine Reviews*. **25**:612–628.

VOLPATO G. T., CALDERON I. M. P., SINZATO S., CAMPOS K. E., RUDGE M. V. C., DAMASCENO D. C. (2011). *Effect of M. nigra aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats*. *J. Ethnopharmacol* **138**: 691-696.

VOLPATO G. T., DAMASCENO D. C., CALDERON I. M. P., RUDGE M. V. C. (2002). *Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetesmellitus*. *Rev Bras. Plantas Med.* **4**:35-45.

VOLPATO G. T., DAMASCENO D. C., RUDGE M. V. C., PADOVANI C. R., CALDERON I. M. P. (2008). *Effect of bauhinia forficata aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats*. *J. Ethnophar.* **116**: 131-137.

WILD S., ROGLIC G., GREEN A., SICREE R., KING H. (2004). *Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030*. *Diabetes Care* **27**: 1047 - 1053.

WU C, ZHANG X, ZHANG X, LUAN H, SUN G, SUN X, WANG X, GUO P, XU X. (2014). *The caffeoylquinic acid-rich Pandanus tectorius fruit extract increases insulin sensitivity and regulates hepatic glucose and lipid metabolism in diabetic db/db mice*. *J Nutr Biochem*. Apr; **25**(4):412-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.12.002. Epub 2013 Dec 31.

XIA M., QIAN L., ZHOU X., GAO Q., BRUCE I. C., XIA Q. (2008). *Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of M. alba (L.)*. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 442-446.

YARAS N, SARIAHMETOGLU M, BILGINOGLU A, AYDEMIR-KOKSOY A, ONAY-BESIKCI A, TURAN B, SCHULZ R. *Br J Pharmacol.* 2008 Dec;155(8):1174-84. doi: 10.1038/bjp.2008.373. Epub 2008 Sep 22.

ZHENG D.;DONG S., LI T., YANG F., YU X., WU J., Zhong X., ZHAO Y., WANG L., XU C., LU F., ZHANG W. (2015). *Exogenous Hydrogen Sulfide Attenuates Cardiac fibrosis Through Reactive Oxygen Species Signal Pathway in Experimental Diabetes Mellitus Models*. *Cell Physiol Biochem.***36**:917-929.

ZHOU Y., MADJIDI A., WILSON M., NOTHHELPER D., JOHNSON J. PALMA J., SCHWEITZER A., BURANT C., BLUME J., JOHNSON J. (2005). *Matrix Metalloproteinases contribute to insulin insufficiency in Zucker diabetic fatty rats*. *Diabetes* **54**:2612-2619.

ANEXOS

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO COM OS RESULTADOS DA TESE.

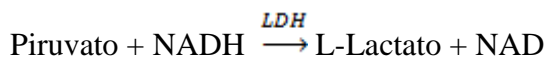
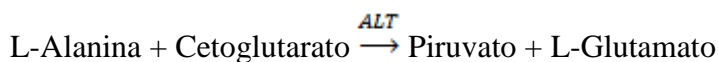
**ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO DURANTE O
DOUTORAMENTO.**

ANEXO 3 – PROTOCOLOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS

- *Alanina Aminotransferase*

Princípio

A ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A consequente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

**Amostra**

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8 °C e por 2 semanas a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

ALT/GPT Liquiform, Catálogo 74-4/30 - ANVISA - 10009010029

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: O conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 - 25 °C e 14 dias entre 2 – 8°C. Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Alanina 500 mmol/L, 2-cetoglutarato 15 mmol/L, NADH 180

Equipamentos

Araujo, C.M.

1. Fotômetro com cubeta termostaticada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do Reagente de Trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

$$\text{ALT/GPT (U/L) 340 nm} = \Delta A/\text{minuto} \times 1746$$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) x 16,7 = Unidades SI (nkat/L).

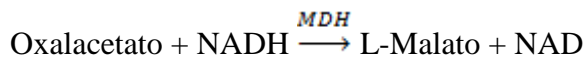
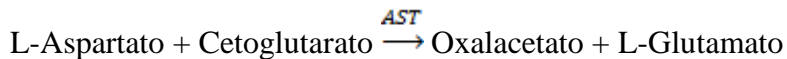
- *Aspartato Aminotransferase*

Princípio

Araujo, C.M.

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD.

A conseqüente redução da absorvância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.



Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (EDTA, heparina). A atividade enzimática é estável por 4 dias entre 2 – 8°C e por 2 semanas a 10°C negativos.

Produto Utilizado

AST/GOT Liquiform, Catálogo 75-4/30 - ANVISA - 10009010018

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente 2: Armazenar entre 2 – 8°C.

Reagente de Trabalho: o conjunto de um frasco de Reagente 1 e de um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho. Estável por 5 dias entre 15 – 25°C e por 14 dias entre 2 – 8°C; Contém tampão 80 mmol/L, pH 7,8, L-Aspartato 240 mmol/L, 2-cetoglutarato 12 mmol/L, NADH 180 µmol/L, LDH ≥900 U/L, MDH ≥600 U/L e azida sódica 14,6 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostaticada a 37 °C capaz de medir a absorvância em 340 ou 365 nm com exatidão.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.

Procedimento

Condições de Reação: comprimento de onda de 340 ou 365 nm; cubeta termostaticada a 37°C com 10 mm de espessura de solução; banda de passagem de 8 nm ou menos e luz espúria menor que 0,1%.

1. Adicionar 0,1 mL de amostra a 1,0 mL do reagente de trabalho.
2. Homogeneizar.
3. Transferir para a cubeta termostaticada a 37 °C.
4. Esperar 1 minuto.
5. Fazer a leitura inicial, disparando simultaneamente o cronômetro.
6. Repetir as leituras após 1, 2 e 3 minutos.

Cálculos

Calcular a média das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{minuto}$) e utilizar para calcular o resultado.

$$\text{AST/GOT (U/L) 340 nm} = \Delta A/\text{minuto} \times 1746$$

Conversão: Unidades Convencionais (U/L) $\times 16,7$ = Unidades SI (nkat/L).

- *Colesterol HDL*

Princípio

As lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (Colesterol HDL) é determinado no sobrenadante.

Amostra

Araujo, C.M.

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol HDL. Usar soro. O analito é estável por 3 dias entre 2 – 8°C.

Produto Utilizado

Colesterol HDL, Catálogo 13 - ANVISA – 10009010026

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Precipitante: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L.

Padrão - 20 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Centrífuga para tubos.
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
3. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
4. Pipetas para medir amostras e reagentes.
5. Cronômetro.

Procedimento

Precipitação das VLDL e LDL

Em um tubo 12 x 75 colocar 0,25mL de soro e 0,25mL de precipitante. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. A agitação sugerida é fundamental para obtenção de resultados consistentes. Centrifugar a 3.500 rpm por pelo menos 15 minutos para obter um sobrenadante límpido. Pipetar o sobrenadante límpido imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado, a fim de evitar resultados falsamente elevados.

Araujo, C.M.

Utilizar com o Reagente 1 - Colesterol Liquiform Labtest Cat. 76. Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	0,1 mL	-----
Padrão (n° 2)	-----	-----	0,1 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 540 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

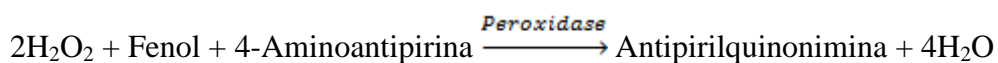
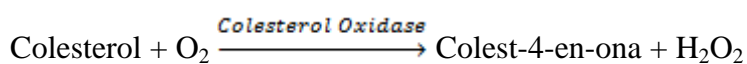
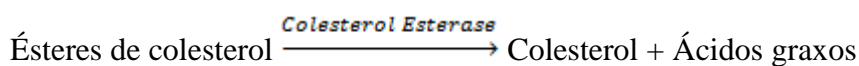
$$\text{HDL mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 40$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

- **Colesterol Total**

Princípio

O colesterol total é determinado de acordo com as seguintes reações:



Araujo, C.M.

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Amostra

O jejum não é imprescindível para a dosagem de colesterol total. Usar soro. Anticoagulantes como citrato, oxalato ou EDTA produzem resultados falsamente diminuídos. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8 °C e vários meses a 10 °C negativos.

Produto Utilizado

Colesterol Liquiform, Catálogo 76-2/100 - ANVISA - 10009010068

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol, pH 7,0, fenol 24,0 mmol/L, colato de sódio 500 µmol/L, azida sódica 15 mmol/L, 4 aminoantipirina 500 µmol/L, colesterol esterase ≥ 250 U/L, colesterol oxidase ≥ 250 U/L e peroxidase ≥ 1000 U/L.

Padrão 200 mg/dL: Armazenar entre 2 – 8°C. Após o manuseio armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 15 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----

Araujo, C.M.

Padrão (n° 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar em banho-maria 37 °C 10 minutos. O nível de água no banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Colesterol mg/dL} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,026

- **Creatinina**

Princípio

O método se baseia na observação de que a reação da creatinina com o picrato alcalino é muito rápida, enquanto a reação do picrato com os cromogênios é mais lenta. A medida da reação nos primeiros minutos permite a determinação da creatinina verdadeira.

A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente.

Creatinina + Ácido Pícrico → Picrato de Creatinina

Amostra

Para creatinina sérica recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Soro ou plasma (heparina, EDTA, fluoreto, oxalato, citrato). O anticoagulante Glistab (Labtest Cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. O analito é estável por 7 dias entre 2 – 8°C.

Produto Utilizado

Araujo, C.M.

Creatinina K, Catálogo 96 - ANVISA - 10009010143

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

NaOH: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém hidróxido de sódio 200 mmol/L.

Ácido Pícrico: Armazenar entre 15 – 30°C. Contém ácido pícrico 22,2 mmol/L.

Padrão - 4,0 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação.

Ferricianeto: Armazenar entre 15 – 30 °C. Contém ferricianeto de potássio 11 mmol/L.

Equipamentos

1. Fotômetro com cubeta termostaticada capaz de medir com exatidão a absorvância em 510 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagente.
3. Cronômetro.

Procedimento

Preparo do picrato alcalino: Misturar 4 volumes de NaOH (nº 1) com 1 volume de Ácido Pícrico (nº 2). Estável 15 dias entre 2 - 8 °C. O CO₂ atmosférico altera significativamente a estabilidade do NaOH (No. 1) e do Picrato Alcalino, quando os reagentes são mantidos em recipientes abertos. A modificação da estabilidade é influenciada pelo tempo de exposição e condições ambientais. Sugerimos manter na bandeja do analisador somente o volume suficiente para a realização de uma corrida analítica ou usar as informações do controle da qualidade como indicador da necessidade de realizar nova calibração.

Procedimento: Ajustar o fotômetro a zero em 510 nm com água destilada. Adicionar 0,1 mL de padrão, soro, plasma ou urina diluída a 1,0 mL do Picrato Alcalino. Misturar e aspirar imediatamente para a cubeta. Disparar um cronômetro e medir as absorvâncias aos 30 e 90 segundos.

Cálculos

ΔA do Teste ou Padrão = Abs 90 segundos – Abs 30 segundos

Araujo, C.M.

$$\text{Creatinina (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ Absorbância do Teste}}{\Delta \text{ Absorbância do padrão}} \times 4$$

- **Glicose**

Princípio

A glicose oxidase catalisa a oxidação da Glicose a Ácido Glucônico e Peróxido de Hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar plasma ou soro. Realizar a colheita do sangue utilizando um anticoagulante contendo um inibidor da glicólise. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de creatinina, glicose e uréia. As amostras de sangue não contendo antiglicolítico devem ser centrifugadas imediatamente após a colheita e o plasma ou soro separados das células ou coágulo.

O analito é estável por 8 horas em amostras colhidas com antiglicolítico. No plasma, soro e outros líquidos separados das células, a glicose permanece estável por 3 dias entre 2 – 8°C, quando não ocorre contaminação bacteriana.

Produto Utilizado

Glicose PAP Liquiform, Catálogo 84-2/250, 84-2/500 -ANVISA - 10009010003

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1: Armazenar entre 2 – 8°C. Contém tampão 50 mmol/L; pH 7,5; glicose oxidase ≥ 11.000 U/L; peroxidase ≥ 700 U/L; 4-aminoantipirina ≥ 290 μ mol/L; fenol ≥ 1 mmol/L e azida sódica 7,5 mmol/L.

Araujo, C.M.

Padrão - 100 mg/dL: Armazenar entre 2 – 30°C. Após o manuseio, sugere-se armazenar bem vedado para evitar evaporação. Contém glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico. O estabilizador do padrão pode precipitar-se em baixas temperaturas, fato que não interfere na sua qualidade.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (n° 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar vigorosamente e colocar em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 540 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 100$$

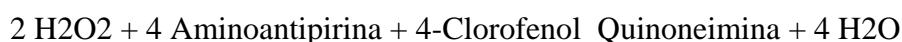
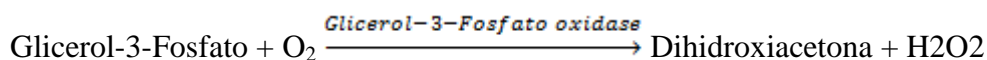
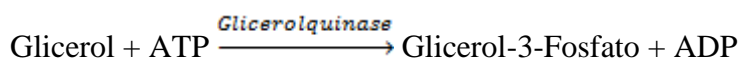
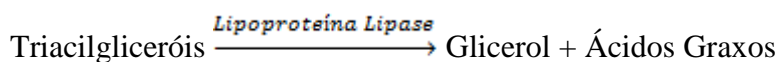
Conversão de mg/dL para unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0556

Araujo, C.M.

- Tracilgliceróis

Princípio

Os triacilgliceróis são determinados de acordo com as seguintes reações:



A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de triacilgliceróis na amostra.

Amostra

Jejum de 12 a 14 horas. Usar soro ou plasma com EDTA. O analito é estável por dois dias entre 2 – 8°C. Armazenamento prolongado da amostra não é recomendado, porque várias substâncias podem ser hidrolizadas liberando glicerol, levando à obtenção de resultados falsamente elevados. A heparina promove a ativação in vivo ou in vitro da lipase da lipoproteína, fazendo com que a concentração dos triacilgliceróis se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

Produto Utilizado

Triacilgliceróis Liquiform, Catálogo 87 - ANVISA - 10009010070

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Contem tampão 50 mmol/L, pH 6,9; acetato de magnésio 4 mmol/L; 4-clorofenol 5 mmol/L; 4-aminoantipirina 300 µmol/L ATP 1,0 mmol/L; lipase da lipoproteína ≥ 1400 U/L; glicerolquinase ≥ 1000 U/L e azida sódica 7 mmol/L.

Araujo, C.M.

Padrão - 200 mg/dL - Armazenar entre 2 - 30 °C. Contém triacilgliceróis 200 mg/dL e azida sódica 7 mmol/L. Após o manuseio sugere-se armazenar bem vedado, para evitar evaporação.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 505 nm ou filtro verde (490 a 520nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37°C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (nº 2)	-----	-----	0,01 mL
Reagente 1 (nº 1)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e colocar no banho-maria 37 °C por 10 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível do reagente nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520 nm) acertando o zero com o branco. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Triacilgliceróis (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/dL x 0,0113

- Uréia

Araujo, C.M.**Princípio**

A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônia e CO₂. Os íons amônia reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar azul de indofenol. A formação de cor é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

Amostra

Recomenda-se jejum mínimo de 8 horas. Usar soro ou plasma (fluoreto, heparina, EDTA) e urina. Não usar anticoagulantes contendo amônia. A concentração de fluoreto na amostra não deve ser maior que 3 mg/mL, pois o fluoreto em altas doses é inibidor da urease. O uso do anticoagulante Glistab (Labtest Cat. 29) permite a colheita de uma só amostra para as dosagens de uréia, glicose e creatinina. O analito é estável no soro ou plasma por 12 horas entre 15 – 25°C, por 3 dias entre 2 – 8°C e 3 meses a 20°C negativos.

Produto Utilizado

Uréia CE, Catálogo 27 - ANVISA - 10009010011

Labtest Diagnóstica: Av. Paulo Ferreira da Costa, 600. Lagoa Santa, MG, 33400-000

Urease: Armazenar entre 2- 8°C. Contém tampão fosfato 10 mmol/L, EDTA 6 mmol/L e urease 268 KU/L.

Tampão (Estoque): Armazenar entre 2- 8°C. Contém tampão fosfato 100 mmol/L pH 6,9, salicilato de sódio 312 mmol/L, nitroprussiato de sódio 16,8 mmol/L.

Oxidante (Estoque): Armazenar entre 2- 8°C. Contém hidróxido de sódio 2,8 mol/L e hipoclorito de sódio 121 mmol/L.

Padrão - 70 mg/dl: Armazenar entre 2- 8°C bem vedado para evitar evaporação. Contém azida sódica 7,7 mmol/L.

Preparo do Tampão de Uso: Adicionar o conteúdo do frasco de tampão (100 mL) a 400 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 12 meses em frasco âmbar, entre 2 – 8°C.

Preparo do Oxidante de Uso: Adicionar o conteúdo do frasco de oxidante (25 mL) a 475 mL de água destilada ou deionizada e misturar. Estável 12 meses em frasco plástico, entre 2 e 8°C.

Araujo, C.M.

Preparo da Urease Tamponada: Adicionar 1,0 mL de urease a 20 mL do Tampão de Uso. Estável por 21 dias em frasco de vidro âmbar, entre 2 – 8°C.

Equipamentos

1. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância em 600 nm (580 a 610 nm).
2. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro

Procedimento

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	0,01 mL	-----
Padrão (n° 2)	-----	-----	0,01 mL
Urease tamponada	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos e adicionar 1,0mL de oxidante de uso em todos os tubos. Misturar e incubar a 37 °C durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 600 nm (580 a 610 nm), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 2 horas.

Cálculos

$$\text{Uréia (mg/dL)} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do padrão}} \times 200$$

Conversão de mg/dL para Unidade SI: mmol/L = mg/ dL x 0,166