



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO
Croton cajucara BENTH
E SEUS EFEITOS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
NO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

Éder Marcolin

Porto Alegre – RS, 2008.

Éder Marcolin

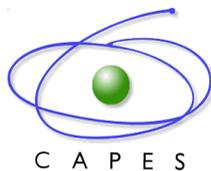
**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO Croton cajucara BENTH
E SEUS EFEITOS SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO
NO DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

Orientadora: Prof. Dra. Norma Possa Marroni

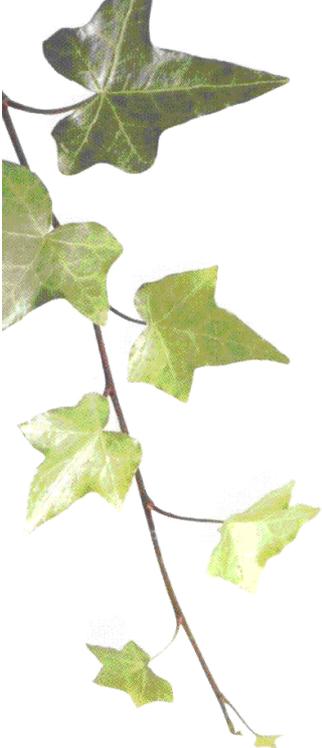
Co-Orientador: Prof. Dr. Marc François Richter

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Porto Alegre – RS, 2008.



Este trabalho foi realizado nas instalações do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Centro de Pesquisas em Ciências Médicas no Laboratório de Farmacocinética da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA). Foi fomentado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE).



Dedicatória

*Aos meus pais, **Américo e Ana**, que me ensinaram a amar com intensidade tudo o que se faz, para se fazer da melhor maneira possível. Pais que eu amo e que são exemplos de pessoas às quais eu sigo. Muito obrigado por todo o esforço para me fazer o que eu sou. Devo tudo a vocês!*

*Ao meu irmão, **Edriano**, pelo exemplo de maturidade centrada, que me coloca muitas vezes na realidade dos momentos da vida! És meu parceiro das brincadeiras e piadas, dos momentos onde preciso estar de mãos dadas!*



A história do Menino Arqueiro

O Sol e a Lua, em pleno fim de inverno, se enamoraram frutificando dois seres irmãos: o Menino com Pés de Vento e o Menino Arqueiro.

Durante a sua jornada, o Menino Arqueiro punha em prática todos os ensinamentos de Sol e Lua, dia após dia, lançando suas flechas cada vez mais longe, mais próximas ao horizonte.

Numa bela manhã de primavera, sua tutora na arte de lançar flechas, a Fada Mestra, lhe apresentou o Menino do Arco, que havia lançado uma flechada para muito longe e estava iniciando sua jornada em busca de sua flecha. A mestra olhou o Menino Arqueiro e falou, com sua voz suntuosa e inebriada de encanto: -Você já está pronto Menino Arqueiro, lance sua melhor flecha! E ele, mesmo estando um pouco temeroso, preparou-se o melhor que pôde, esforçou-se até a exaustão puxando a corda do arco e lançou a sua melhor flecha, uma flecha dourada que havia recebido de Sol e Lua, chamada Vida. Seus braços pareciam não tolerar todo aquele esforço, seus dedos tremiam como se fossem romper-se, mas ele lançou, e a flecha voou tão alta e tão rápida que se perdeu no horizonte, por detrás de imensas montanhas, rumo à algum lugar desconhecido. Junto ao Menino existiam outros e

outras, todos aprendendo e tentando lançar suas flechas, cada qual a sua maneira, mas todos juntos aprendendo mutuamente a arte dos arqueiros.

A Fada Mestra olhou sorridente para o Menino Arqueiro, vendo todo o seu esforço, e lhe disse: - Agora que lançastes sua flecha, siga o caminho e vá encontrá-la.

Mas que caminho era este? Quantas dificuldades teria ele que enfrentar para buscar a sua flecha? Mas, ele não estaria sozinho no caminho, Sol e Lua sempre a velá-lo, Fada Mestra e sua corte também.

E o Menino Arqueiro, de peito aberto, começou a andar, meio sem jeito a percorrer o caminho chamado Destino, até as grandes montanhas onde acreditava que sua Flecha Vida estava a lhe esperar. Olhava para os lados e via muitos outros percorrendo seus caminhos, até a Menina de Cabelo de Ouro, que teve seu ventre preenchido de esperança, ao caminhar pela perigosa estrada.

Ao chegar a uma grande curva do Destino, em lugar com muito vento e frio, costeando um grande despenhadeiro, o Menino Arqueiro já cansado, indeciso, foi alvo de um dos perigos do caminho. Ele foi alvejado por uma lança negra, sem saber de onde ela tinha vindo, só sabia que ela o havia atravessado e acertado seu coração. Desfalecido, o Menino Arqueiro que estava em busca de sua flecha Vida, caiu ao solo e, como num pesadelo, não conseguia se mexer, não via mais nada, só sentia muita dor. Deitado na terra negra e quase sem vida, ouve a aproximação de alguns seres. Sente uma mão tocando em sua cabeça e em seu peito. Era a Fada dos Sonhos com seu grupo de Anjos de Uma Só Asa. O Menino Arqueiro, desde então, não sentia mais dor, só permaneceu uma cicatriz que se tornava menor a cada instante. A Fada com seus olhos negros e sorriso largo o fez levantar e o lançou novamente a caminho em busca da flecha Vida.

Caminhando, mesmo um pouco perdido e com a sua cicatriz, ele encontra a Fada Mestra sentada numa grande árvore. A fada o mirou e lhe disse que não poderia mais percorrer o caminho por esta estrada. Ordenou que ele migrasse para o Terra dos Leões e se apresentasse aos Mestres Leoneses. A única instrução era: - Siga o caminho das Conchas Douradas.

E o Menino, buscando o Caminho das Conchas, encontrou o Novo Velho Mundo, onde os meninos e as meninas, que se chamavam de *Ticos e Ticas*, falavam de uma maneira diferente, *hablavam de una forma rara y muy hermosa*, dançavam pelas pequenas *calles*, com uma maturidade ingênua e bonita de se ver, deixando o Menino muito feliz. Havia uma fonte de água que lançava jatos para todos os lados, e aí estava a Menina Arqueira, irmã de alma do Menino, a lhe esperar. Ela precisava levá-lo aos Mestres Leoneses, que o esperavam. Eles partiram pelas conchas chegando a um enorme templo de pedras também douradas com uma enorme mandala azul brilhante no topo. Lá estavam os Mestres da Terra dos Leões, que o prepararam para seguir novamente o caminho em busca de sua Vida.

O Menino Arqueiro, que agora já não era mais apenas um menino, estava mais forte, mais rápido e mais experiente quanto aos perigos do trajeto, vislumbrou suas montanhas ao longe, como quem se prepara para acertar um alvo. E lá ele foi, dias andando até chegar nas altas Montanhas de *Strictus Sensus*, onde sua flecha Vida o aguardava. Lá, também estava a Fada Mestra lhe aguardando. Ele, ansioso, correu para encontrá-la pois estava muito próximo de Vida. A Fada o acolheu, mirou em seu olhos e disse: - Homem Arqueiro, você usou toda a sua técnica e força para lançar sua flecha, ela não está aqui. Você precisa continuar a caminhar, pois a sua flecha lhe espera mais além...!



Agradecimentos

- A **Deus**, por estar comigo em cada momento e me presentiar com amigos.
- Aos meus pais, **Ana e Américo**, simplesmente minha Lua e meu Sol.
- Ao meu irmão, **Edriano**, que com voa pelo mundo como se houvesse asas nos pés.
- Em especial a minha *Fada Mestra*, a **Dra. Norma Possa Marroni**, minha orientadora, pela sua exigente orientação que me torna cada dia mais preciso em tudo o que faço. Obrigado por ter me apresentado um mundo novo de expectativas e por ter entrado na minha vida desde a minha graduação. Também, pelo carinho e atenção, por ser muito mais que uma orientadora, por ser uma amiga, *mama* e companheira de muitas viagens.
- Ao **Dr. Marc François Richter**, meu co-orientador, verdadeiro mago das cromatografias, por todos os ensinamentos, por me preparar tão bem e me ensinar a *domar* um HPLC. Obrigado pela sua simplicidade e incentivo desde o início de minha trajetória.
- Ao **Dr. Alexandre Simões Dias**, mestre, doutor e colega, que mesmo sem saber, é personagem fundamental, ao despertar o meu interesse pela pesquisa, sendo um exemplo como fisioterapeuta, como pesquisador, como amigo e como ser humano. Obrigado por ser o *Menino do Arco*, o qual pude observar e almejar um caminho a seguir.

- Aos **meus amigos e colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia**, em especial, a Sílvia, Graziella, Rafael, Dra. Marilene, Dr. Henrique, Dr. Cláudio, Nelson, Lidiane, Cíntia, Luís, Maurício, *Meninos e Meninas do Caminho*, e todos que estiveram comigo percorrendo este caminho. Obrigado por enriquecer de forma ímpar o meu trabalho, pelos conhecimentos e técnicas, pelo empenho e dedicação e pela amizade.
- Ao **Giovanni**, pelo apoio constante e auxílio, não somente técnico, mas com suas palavras sempre agradáveis e confiantes.
- À minha grande amiga e colega de mestrado **Camila Marques Ávila**, *menina, mulher e mãe de cabelos de ouro*, obrigado pelo carinho, confiança, amizade, companheirismo nos dias felizes e tristes. Lembre sempre do nosso juramento: “Vamos rir muito disso”.
- À **Patrícia Flores**, que soube me guiar em tempos difíceis até um mundo sonhos felizes, pela maestria de entender minhas angústias e medos sabendo onde eu tinha lançado minha flecha. Obrigado pela ajuda nos tropeços do caminho.
- Aos meus grandes amigos **Beto, Carla, Fernanda, Alexsandra, Ana, minha afilhada Mariana, grupo Água Viva** e todos aqueles amigos-irmãos que são meus *anjos de uma só asa*.
- À irmã de alma, **Juliana Tieppo**, pela sempre atenciosa amizade, pelo carinho e afetividade. Obrigado pelas nossas aventuras e não esqueça do nosso compromisso, temos um livro a escrever.
- A todos os **amigos e hermanos de León** pela amizade, carinho e pelas *tapas*.

- A todos do **Departamento de Ciências Biomédicas da Universidad de León**, Espanha, pela acolhida e confiança.

- A todos do **Departamento de Fisiologia da UFRGS**, aos professores, colegas e as secretárias Alice e Fabiana, obrigado pela atenção, pelo carinho, pelos ensinamentos, por fazerem parte da minha vida e pela oportunidade de participar deste programa de Pós-Graduação.

- A todos do **Centro de Pesquisa Experimental** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Experimentação Animal e ao GPPG, obrigado pelo carinho, atenção, confiança, respeito, organização e pela recepção do nosso grupo neste centro.



*"Algumas pessoas sonham com o sucesso, outras
levantam cedo e batalham para alcançá-lo"*

Aleksander Mandic

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença endócrino-metabólica freqüente, com expectativa de alcançar 350 milhões de pessoas no mundo em 2025, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). Estudos experimentais e clínicos sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese e na progressão desta doença. A espécie *Croton cajucara* BENTH (CcB) é uma planta da região amazônica que tem suas folhas e casca do caule utilizadas pela população na forma de chá ou cápsulas, para tratar várias doenças, dentre elas, o DM. Este estudo tem como objetivo observar o efeito do extrato aquoso da casca do *Croton cajucara* BENTH em relação ao estresse oxidativo, avaliando o seu potencial antioxidante, *in vitro*, pelo sistema enzimático da Xantina Oxidase (XO) e, *in vivo*, pelo potencial de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e pelo tratamento de ratos diabéticos, induzidos por estreptozotocina (STZ). Foram avaliados os níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos e as enzimas indicadoras de função hepática Aspartato-aminotransferase (AST), Alanina- aminotransferase (ALT) e Fosfatase alcalina (FA). Estando o DM envolvido com os níveis de lipoperoxidação, padronizou-se e validou-se uma metodologia para determinação de Malondialdeído (MDA) através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC ou CLAE). Avaliou-se também, a atividade da enzima antioxidante endógena glutationa peroxidase (GPx). Utilizou-se ratos machos *Wistar*, pesando entre 250 e 350 gramas, que foram divididos nos grupos: controle (CO); controle com tratamento de 5 dias com CcB (CO5d); controle com tratamento de 20 dias com CcB (CO20d); diabéticos (DM); diabéticos com tratamento de 5 dias com CcB (DM5d); e diabéticos com tratamento de 20 dias com CcB (DM20d). O DM foi induzido por administração intraperitoneal de STZ na dose de 70mg/Kg. Os resultados obtidos demonstraram uma capacidade antioxidante dependente de volume e dose através do teste enzimático da XO e pelo ensaio *in vivo* com a levedura de *S. cerevisiae*. O CcB, no modelo experimental de DM, não apresentou variações sobre o peso corporal dos animais mas, apresentou uma tendência mais forte na redução dos níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos nos diabéticos tratados por 5 dias, bem como, a redução dos níveis de ALT e FA. E, através das medidas realizadas pela metodologia implantada e validada, demonstrou-se uma queda nos níveis de MDA nos grupos diabéticos tratados com CcB. Porém, não foram observadas alterações significativas na GPx. Com base nestes resultados, acredita-se que a planta *Croton cajucara* BENTH possua ação antioxidante sobre os modelos estudados.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus, *Croton cajucara* BENTH, Estresse Oxidativo e HPLC.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is an endocrine-metabolic frequent disease, with, according to the expectations of the World Health Organization (WHO), may reach 350 million people worldwide in 2025. Experimental and clinical studies suggest that oxidative stress is involved in the pathogenesis and progression of this disease. The species *Croton cajucara* BENTH (CcB) is a plant from the Amazon region and its leaves and stem-bark are used by the population in the form of tea or capsules for treating different diseases, including DM. The aim of the present study is to observe the effect of the aqueous extract of the bark of *Croton cajucara* BENTH in relation to oxidative stress, assessing its potential in vitro antioxidant activity, using the Xantina Oxidase (XO) enzyme-based system and, its in vivo activity, using the survival assay in yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells, and by treating diabetic rats, which are induced with streptozotocine (STZ). We evaluated the glucose-, cholesterol- as well as triglycerides levels, and enzyme indicators Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT) and Alkaline Phosphatase (FA) for evaluation of liver function. Due to the relation of DM and levels of lipoperoxidation, we standardized and validated a methodology for determination of Malondialdehyde (MDA) by high performance liquid chromatography (HPLC). Also the activity of the endogenous antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) was evaluated. Male Wistar rats, weighing between 250 and 350 grams, were used, which were divided in the following groups: control group (CO); control group with 5 days of CcB treatment (CO5d); diabetic group with 20 days of CcB treatment (CO20d); diabetic group (DM); diabetic group with 5 days of CcB treatment (DM5d); diabetic group with 20 days of CcB treatment (DM20d). DM was induced by intraperitoneal administration of STZ at a dose of 70mg/Kg. Results show a dose- and volume-dependent antioxidant capacity in the XO enzymatic assay, and in vivo with yeast *S. cerevisiae*. CcB, using the experimental model of DM, had no effect on variations of the weight, but presented a stronger trend in reducing levels of blood glucose, cholesterol and triglycerides in diabetic rats treated for 5 days, and showed also a reduction of ALT and FA levels. In addition, measuring MDA levels by HPLC, a drop in MDA-levels could be shown in both diabetic groups treated with CcB. However, no significant changes were observed in GPx. Based on these results, we believe that the *Croton cajucara* BENTH plant have an antioxidant activity in the studied models.

Key-Words: Diabetes Mellitus, *Croton cajucara* BENTH, Oxidative Stress and HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito da hiperglicemia na formação da proteína glicosilada e da auto-oxidação da glicose, bem como a formação das espécies ativas de oxigênio (EAO) e o aumento da via do sorbitol. GSH- glutationa reduzida	34
Figura 2. Atuação da estreptozotocina nas células pancreáticas beta (produtoras de insulina).....	37
Figura 3. Redução do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria até a formação de água (H ₂ O).	41
Figura 4. Decomposição catalítica pelos íons Fe ²⁺ do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos, com conseqüente formação de radicais hidroxil (OH [•])	42
Figura 5. Representação esquemática da reação da LPO.....	44
Figura 6. Vista geral da planta Croton cajucara BENTH em seu ambiente natural ..	50
Figura 7. Vista geral das folhas de Croton cajucara BENTH.....	51
Figura 8. Cascas do caule do Croton cajucara BENTH.....	52
Figura 9. Componentes da raiz, casca e folhas do Croton Cajucara BENTH	53
Figura 10. Substâncias isoladas da folha do Croton Cajucara BENTH	54
Figura 11. Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo	61
Figura 12. Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes utilizando o sistema da Hipoxantina/Xantina Oxidase.....	71
Figura 13. Reação do ácido salicílico com os radicais hidroxila formando 2,3- e 2,5-DHBA	74
Figura 15. Pontencial antioxidante in vitro de várias concentrações e volumes de EAC de CCB.	87
Figura 16. Potencial antioxidante <i>in vitro</i> do CcB.	89
Figura 17. Dispersão dos Dados do Potencial antioxidante <i>in vitro</i> do CcB correlacionando as variáveis de DHBA, dose e concentração.....	89
Figura 18. Potencial antioxidante <i>in vivo</i> do CcB.....	90
Figura 19. Diferenças médias dos pesos corporais e Intervalo de Confiança 95%. ..	92
Figura 20. Diferenças médias para os níveis glicêmicos e Intervalo de Confiança 95%.	93
Figura 21. Diferenças médias para os níveis de colesterol e Intervalo de Confiança 95%.	94
Figura 22. Diferenças médias para os níveis de triglicerídeos e Intervalo de Confiança 95%.	95
Figura 23. Médias e desvios padrão das médias para os níveis de aspartato-aminotransferase.....	97
Figura 24. Diferenças médias e desvios padrão das médias para os níveis de alanina-aminotransferase.....	98
Figura 25. Diferenças médias e desvios padrão das médias para os níveis de Fosfatase Alcalina.	99
Figura 26. Cromatogramas de MDA.....	102
Figura 27. Diferenças médias e desvios padrão das médias para as áreas cromatográficas de concentração de MDA, tendo sido realizadas 3 mensurações por dia em 3 dias distintos para avaliar o método.	103

Figura 28. Médias \pm desvios padrão das médias para os níveis de Malondialdeído	104
Figura 29. Médias \pm desvios padrão das médias para os níveis de Glutathione Peroxidase	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontencial antioxidante in vitro de várias concentrações e volumes de EAC de CCB.....	86
Tabela 2. Coeficientes das variáveis de Regressão Linear Múltipla para o desfecho DHBA (%).	88
Tabela 3. Correlação de Pearson para percentagem de DHBA, dose e concentração de EAC de CcB.	88
Tabela 4. Médias Basais dos grupos experimentais.....	91
Tabela 5. Peso Corporal.	92
Tabela 6. Níveis glicêmicos.	93
Tabela 7. Níveis de colesterol.....	94
Tabela 8. Níveis de triglicerídeos.....	95
Tabela 9. Atividade das Aminotransferases Hepáticas.....	96
Tabela 10. Atividade da enzima Glutathiona Peroxidase (GPx).	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

·ROO	Radical peroxil
°C	Graus Celsius
AAA	Ácido acetil aleuritólico
ALT	Alanina-aminotrasferase
AST	Aspartato-aminotrasferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CcB	<i>Croton cajucara</i> BENTH
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO	Controle
CO 5d	Controle tratado por 5 dias
CO 20d	Controle tratado por 20 dias
CTN	Trans-crotonina
Cu ²⁺	Íon Cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CuZnSOD	SOD cobre e zinco
d/L	Decilitro
DCTN	Trans-dehidrocrotonina
DHBA	Dihidroxi-ácido-benzóico
DM	Diabetes Mellitus
DM 5d	Diabético tratado por 5 dias
DM 20d	Diabético tratado por 20 dias
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNPH	Dinitrofenihidrazina
e ⁻	Elétron
EA	Extrato aquoso
EAC	Extrato aquoso da casca
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
EDTA	Ácido etilendiamminotetraacético
FA	Fosfatase alcalina
Fe ²⁺	Íon ferro

FeSOD	SOD ferro
g	Gramma
GPx	Glutaciona Peroxidase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSH	Glutaciona Oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KCl	Cloreto de Potássio
Kg	Quilograma
L	Litro
LPO	Lipoperoxidação
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Micromol
MnSOD	SOD manganês
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Adenina dinucleotideo
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂	Oxigênio
O ₂	Radical ânion superóxido
OH	Radical Hidroxila
P	Fosfato
pH	Potencial de Hidrogênio

PKA	Proteína quinase A
POD	Piruvato oxidase
RL	Radical Livre
ROOH	Peróxido orgânico
rpm	Rotação por minuto
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Estreptozocina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
t-BOOH	Hidroperóxido de tert-butila
U	Unidade
v/v	Volume por volume
Zn ²⁺	Zinco
μ	Micra
μg	Micrograma
μl	Microlitro
XO	Xantina Oxidase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1 REFERENCIAL TEÓRICO	27
1.1 Diabetes Mellitus (DM).....	27
1.2 Diabetes Mellitus Experimental.....	35
1.3 Espécies Ativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo	38
1.4 Diabetes Mellitus e o Estresse Oxidativo	47
1.5 <i>Croton cajucara</i> BENTH	48
1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	56
1.7 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como Modelo de Estudo	59
1.7.1 Defesas antioxidantes da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61
2 OBJETIVOS	64
2.1 Objetivo Geral	64
2.2 Objetivos Específicos.....	64
3 MATERIAIS E MÉTODOS	67
3.1 Delineamento da Pesquisa	67
3.2 Animais	67
3.3 Considerações Bioéticas	68
3.4 Delineamento Experimental.....	68
3.5 Marcação e Pesagem	69
3.6 Indução do Diabetes Mellitus.....	69
3.7 Preparação do Extrato Aquoso da Casca do caule de <i>Croton cajucara</i> BENTH.....	69
3.8 Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> do <i>Croton cajucara</i> BENTH pelo sistema enzimático Xantina Oxidase por HPLC.....	70
3.9 Avaliação do Potencial Antioxidante <i>in vivo</i> do <i>Croton cajucara</i> BENTH através da levedura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
3.9.1 Meios de cultura e soluções.....	75
3.9.2 Detecção da atividade antioxidante <i>in vivo</i> em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
3.10 Morte dos Animais	76
3.11 Obtenção do Plasma e Determinação da Glicemia, Colesterol e Triglicérides.....	76
3.12 Atividade das Aminotransferases (AST, ALT e FA) – Provas de Integridade Hepática.....	77
3.13 Preparo do Homogeneizado	78
3.14 Quantificação das Proteínas.....	79
3.15 Determinação do Estresse Oxidativo	79
3.15.1 Mensuração de Malondialdeído (MDA) por HPLC.....	79
3.15.2 Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx).....	80
3.16 Análise Estatística.....	81
4 RESULTADOS	83
4.1 Potencial Antioxidante <i>in vitro</i> do <i>Croton cajucara</i> BENTH pelo sistema enzimático Xantina Oxidase por HPLC	83
4.2 Atividade Antioxidante <i>in vivo</i> do <i>Croton cajucara</i> BENTH através da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	90
4.3 Avaliações Basais	91
4.4 Peso Corporal	91
4.5 Níveis de Glicemia, Colesterol e Triglicérides	93
4.6 Provas de Função Hepática através da atividade das transaminases AST (aspartato-aminotransferase), ALT (alanina-aminotransferase) e da FA (Fosfatase Alcalina)	96
4.7 Determinação do Estresse Oxidativo.....	100
4.7.1 Mensuração de MDA (malondialdeído) via HPLC.....	100
4.7.2 Glutaciona Peroxidase (GPx).....	105

5 DISCUSSÃO	107
CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

INTRODUÇÃO



INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença que apresenta elevada incidência e prevalência na população em diversas partes do mundo. É uma doença que acomete diversos sistemas corporais com complicações freqüentes, decorrentes das alterações teciduais e vasculares, manifestando-se através de doença vascular periférica, doença isquêmica cardíaca e doenças cerebrovasculares^[1].

No Brasil, estima-se a existência de 6 milhões de diabéticos, metade dos quais faz acompanhamento nas Unidades Básicas do Sistema Único de Saúde (SUS)^[2].

O DM emergiu como uma das principais ameaças à saúde mundial. A incidência crescente do diabetes em indivíduos jovens é particularmente preocupante, pois a doença pode evoluir por anos^[3] e, há evidências de que o estresse oxidativo aumente as complicações diabéticas, o que indica o seu envolvimento na instalação e desenvolvimento da doença^[4, 5].

O DM é uma doença metabólica que se caracteriza pelo aumento da glicose sangüínea, produzindo sérias conseqüências ao organismo, como aumento na formação de Espécies Ativas de Oxigênio (EAO), que causam alterações no balanço intracelular, razão pela qual se valoriza a importância da análise do real papel dos antioxidantes sobre o DM^[6].

Com a dicotomia do metabolismo oxidativo, entre a geração e a varredura de EAO, é intuitivo pensar no estresse oxidativo como uma forma de aumento na produção ou redução da *clearance* de EAOs, devido ao enfraquecimento dos mecanismos de defesa antioxidante. Enquanto esse paradigma pode ser esclarecido

em diversas doenças humanas, como na arteriosclerose e na lesão miocárdica da isquemia-reperfusão, no DM ainda não foi avaliado e há evidências que a rota de defesas antioxidantes permanece ativa, se não hiperativa, na resistência insulínica e diabetes^[6].

O envolvimento das EAO como fatores de lesão da membrana celular, dos ácidos nucléicos e das proteínas constituintes da célula, gerando inúmeras doenças, vem se confirmando através dos recentes estudos^[7]. As fontes exógenas de geração de EAO incluem radiação, fumo, estresse, medicamentos e substâncias como xenobióticos, compostos azo aromáticos e biperidil^[8].

Nas membranas mitocondriais, encontram-se as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio à água durante o processo da respiração celular. Essa redução requer quatro sucessivas transferências de elétrons. Esta teoria foi denominada de redução univalente. Dois desses intermediários são chamados de radicais livres. São eles: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet})^[4].

Para proteger o organismo destas EAO e do estresse oxidativo existem os antioxidantes endógenos, como a catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e, antioxidantes que também podem ser exógenos como a vitamina A, a vitamina E e o ácido ascórbico. Vários autores descrevem ainda que os fitoterápicos, entre eles os bioflavonóides, teriam também uma ação antioxidativa. Alguns flavonóides, como a rutina e a quercetina, estão sendo estudados e apresentaram bons resultados como antioxidantes^[9-11].

Estudos mostram que várias doenças são associadas com danos oxidativos, pela formação de EAO e outros radicais livres, que podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Uma forma adequada de amenizar essa situação é o uso de substâncias antioxidantes^[4].

Muitas plantas são citadas quanto aos seus efeitos antioxidativos^[12]. A espécie *Croton cajucara* BENTH (Euphorbiaceae) é encontrada na região Norte do Brasil e, na Amazônia, onde é popularmente conhecida como Sacaca, que significa “feitiço” na língua Tupi, representa um recurso medicinal de grande importância no tratamento de várias doenças^[13].

A folha e a casca do caule dessa planta são utilizadas de forma empírica pela população na forma de chá, para o tratamento do DM, diarreia, malária, febre e distúrbios gastrintestinais, renais, hepáticos e no controle de níveis elevados de colesterol^[13].

O *Croton cajucara* BENTH (CcB) é uma de muitas plantas que são indicadas em tratamentos de disfunções hepáticas, controle de hiperglicemia e hiperlipidemia usadas pela população, sem que haja dados precisos quanto às interações e posologia para sua utilização. Mesmo sendo recomendada para tratamento de alterações hepáticas, não estão claros seus prováveis efeitos positivos ou negativos sobre a função hepática, assim como sua ação anti ou pró-oxidante e sua atividade mutagênica^[14].

Os estudos de ação do CcB iniciaram a partir da verificação do seu uso freqüente pela população do Norte do país, visando a comprovação dos efeitos relacionados ao seu uso prolongado e efeitos relacionados com casos de hepatite tóxica ocorridos em Belém^[15].

Inúmeros métodos são aplicados para a determinação do potencial antioxidante de compostos em ensaios laboratoriais^[16] e uma tecnologia que está cada vez mais incorporada às rotinas científicas, devido à sua apurada sensibilidade e eficiência, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou, como é internacionalmente identificada, HPLC – High Performance Liquid Chromatography)^[17].

Pretende-se, neste estudo, mimetizar o uso terapêutico da planta pela população humana em um modelo animal de ratos *Wistar* diabéticos e avaliar se a casca do *Croton cajucara* BENTH tem atividade antioxidante, através de estudos químicos e biológicos.

Para avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso de *Croton cajucara* BENTH foi empregada uma metodologia a base da enzima Xantina Oxidase, através de HPLC e, por meio de ensaios biológicos *in vivo*, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, previamente tratada com CcB para avaliar o percentual de sobrevivência à exposição ao agente oxidante peróxido de hidrogênio (H₂O₂) determinando assim, o potencial antioxidante. Utilizou-se também, um modelo animal com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, para verificar o efeito da

administração do extrato aquoso da casca de Sacaca, avaliando o peso corporal dos animais; o nível de glicemia, colesterol e triglicerídeos; a atividade das aminotransferases AST (aspartato-aminotransferase) e da ALT (alanina-aminotransferase) e da FA (Fosfatase Alcalina) no plasma, como indicadores de dano hepático. Objetivou-se ainda, desenvolver, adaptar e implantar uma metodologia para medir o malondialdeído (MDA) via HPLC em homogeneizados de fígado, um dos principais produtos formados pelo processo oxidativo de hidroperóxidos lipídicos^[16], empregado para avaliação do dano tecidual provocado pela peroxidação lipídica, que está implicada em diversas doenças, incluindo o Diabetes Mellitus. Também, a atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) foi avaliada, pois faz parte de um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres^[18].

A natureza nos oferece uma fonte de inúmeros produtos naturais, representados pela flora e fauna brasileira, que apresentam um extraordinário reservatório de substâncias com potencial terapêutico. O CcB é uma planta utilizada empiricamente pela população no tratamento de diversas enfermidades, o que a torna passível de investigação para verificar suas possíveis propriedades antioxidantes.

REFERENCIAL TEÓRICO



1 REFERENCIAL TEÓRICO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a civilização humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais^[15].

“Observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos”^[15].

1.1 Diabetes Mellitus (DM)

As células do organismo necessitam de energia para se manterem vivas e para realizar inúmeras reações intra e extracelulares. O ciclo metabólico inicia-se na ingestão e na absorção dos nutrientes. A partir daí, a energia será estocada nos grandes “reservatórios” corporais: o fígado, tecido adiposo e muscular. O tecido hepático estoca a glicose absorvida sob a forma de glicogênio hepático e, com gasto energético aumentado no metabolismo corporal, o glicogênio hepático é degradado na forma de moléculas de glicose, que são liberadas na circulação e utilizadas pelas células que as necessitam^[19].

O tecido adiposo contribui na formação de energia através da liberação dos ácidos graxos e glicerol, a partir da degradação dos triglicerídeos. Este processo, a lipólise, ocorre por intermédio da ação da enzima lipase^[20], pelo estímulo hormonal da insulina, indutora do aumento intracelular do 2º mensageiro, a Adenosina Monofosfato Cíclico (AMP Cíclico), a qual ativa a proteína quinase A (PKA), que por sua vez ativa a lipase. Esta hidrolisa os triglicerídeos armazenados em glicerol e ácidos graxos liberados na circulação e utilizados por diferentes tecidos corporais. O glicerol, depois de fosforilado e oxidado, se isomeriza e ingressa na via glicolítica, seja para forma glicose (gliconeogênese) ou para se transformar em piruvato e, participar das reações de ciclo de Krebs. Os ácidos graxos são transportados, ligados à albumina e, podem ser oxidados em uma série de reações, até participarem da β -oxidação^[20].

O perfeito funcionamento dessa maquinaria metabólica, para a glicose entrar na célula e participar no processo de formação de energia celular, depende da insulina sangüínea, que se liga a um receptor de membrana celular específico e aumenta o transporte da glicose sangüínea para o interior da célula. As alterações na ligação insulina-receptor, dificultarão a entrada de glicose no interior celular, como nos diabéticos que, conforme o tipo tem redução na secreção de insulina ou alteração na sinalização intracelular, posterior à ligação insulina-receptor^[21].

Os primeiros relatos de DM datam da era egípcia. Entre os hebreus há relatos com suspeita da ocorrência do diabetes gestacional. No entanto, somente cerca de 2000 mil anos depois, por volta de 70 d.C, Areteu da Capadócia, na Grécia, descreveu o diabetes. Areteu observou que aquele silencioso problema desenvolvia quatro complicações: muita fome (polifagia), muita sede (polidipsia), muita urina (poliúria) e fraqueza (poliastenia) e quase sempre, as pessoas com esses sintomas entravam em coma antes da morte. Era algo "grave e misterioso". Afinal, mesmo com a fartura de alimentos que entravam pela boca, a falta de energia corporal permanecia^[22].

Desde Areteu, num período de 1600 anos, a Medicina não evoluiu no estudo do diabetes. Só em 1670 é que o médico inglês Thomas Willis descobriu, provando a urina de indivíduos que apresentavam os sintomas descritos anteriormente, que ela era "muitíssimo doce, cheia de açúcar". Em 1815 o Dr. M. Chevreul demonstrou que

o açúcar dos diabéticos era glicose. Por esta razão, os médicos passaram a provar a urina das pessoas sob suspeita de diabetes e a doença passou a chamar-se "diabetes açúcarada" ou "Diabetes Mellitus". A palavra "Mellitus" provém do latim e quer dizer "mel ou adocicado"^[22].

O DM, conhecido por afetar seres humanos desde os tempos antigos, foi descrito como a doença que culminava em conseqüências calamitosas. Arateus (81-138 d.C.) escreveu sobre a "maravilhosa" natureza da doença, que consistia em "desfazer o corpo em urina", e era acompanhada por uma terrível sede que não podia ser saciada. A concentração abundante de glicose carregada pela urina deu à doença seu nome. *Diabetes* refere-se ao fluxo de fluido através do sifão e *mellitus* vem da palavra mel. Na idade média, o DM era conhecido como "a doença da má urina" ^[23].

Posteriormente, em 1889, dois cientistas alemães, Von Mering e Minkowski, descobriram que o pâncreas produz uma substância capaz de controlar o açúcar no sangue e evitar os sintomas do diabetes. Não havia o conceito de hormônio ou secreção interna. Em 1849, Arnold Adolph Berthold (1803-1861), fisiologista em Goettingen, por meio de experiências realizadas em galos, demonstrou a existência de vazamento de "alguma substância interna"^[22].

Mas foi Claude Bernard, quem usou pela primeira vez o termo "secreção interna". A denominação Endocrinologia entrou em uso no século XX, derivada de endon (interno) e krino (separar), ambos do grego clássico. O termo hormônio foi utilizado pela primeira vez pelo Prof. Ernest H. Starling. Nesta época já havia relatos de que o mau funcionamento do pâncreas seria o responsável pelo diabetes^[22].

A definição do Diabetes Mellitus (DM) está baseada em critérios descritos por Harris e Cahill (1978), dividindo-se em duas classes: DM tipo I, que compreende 10% do total de casos, caracterizado pela deficiência das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas em produzir a insulina e DM tipo II, abrangendo cerca de 90% do total de casos, caracterizando por uma resistência na captação da glicose sanguínea^[24, 25].

Outra forma atual de classificar o DM é por estágios de desenvolvimento, incluindo estágios pré-clínicos e clínicos, estando neste último incluídos os estágios avançados em que a insulina é necessária para controle ou sobrevivência^[25].

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sangüíneos^[25] e distúrbios no metabolismo dos glicídios, lipídios e proteínas, resultantes de deficiências na secreção ou ação da insulina, ou ambas. Pode apresentar sintomas característicos tais como sede, poliúria, visão turva e perda de peso e, em casos mais graves, pode desenvolver cetoacidose, ou um estado hiperosmolar não-cetônico que pode conduzir à letargia, coma e, na ausência de tratamento adequado, à morte^[26].

O DM é uma doença endócrino-metabólica freqüente, de incidência crescente, que afeta mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo^[27] e continua a ser um desafio terapêutico apesar dos avanços no seu tratamento e prognóstico no último século, pois permanece como uma doença de alta morbidade e mortalidade. A prevenção, o tratamento e a cura do Diabetes Mellitus são desafios de ordem mundial, visto que se estima uma cifra 5,4% da população adulta mundial afetada pela doença até 2025^[25, 28].

Dados sobre a incidência e prevalência do DM, no Brasil e no mundo, não são muito acurados porém, sabe-se que mais de 18 milhões de americanos vivem com a doença atualmente e aproximadamente 1,3 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano^[28].

Em 2000, havia aproximadamente 171 milhões de diabéticos no mundo e estima-se que este número aumente para 366 milhões em 2030^[29]. No Brasil, segundo estimativas do Ministério da Saúde, em 1996 havia aproximadamente 5 milhões de diabéticos, sendo 90% destes do tipo II e 10% do tipo I^[2].

O “Diabetes Health Economics Study Groups” da Federação Internacional de Diabetes, estima que em 2025, cerca de 300 milhões de pessoas apresentarão esta doença^[30]. Embora o DM tipo II seja o mais preocupante devido a sua prevalência crescente nos últimos anos, o DM tipo I cresce paralelamente^[31].

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos sobre o DM tipo I^[31]. Estudos em três cidades do interior paulista, constataram a incidência de 7,6/100.000 habitantes naquela população^[32] e em Londrina, no estado do Paraná, a taxa encontrada foi de 12,7/100.000 habitantes^[33].

As complicações secundárias, segundo componente deste enfoque sobre o DM, são decorrentes da exposição crônica do organismo a níveis elevados de glicose e, são observadas em 30% a 50% dos pacientes com DM^[34]. Resultam, também, no comprometimento da qualidade de vida, na incapacidade para o trabalho e podem provocar a morte prematura, além de onerarem excessivamente o sistema de saúde^[29, 35].

A prevalência do diabetes vem crescendo de forma notável e o advento da industrialização e urbanização populacional ocorrido nos últimos anos acelera este processo^[31]. As mudanças no estilo de vida reduziram a atividade física que, juntamente com uma alimentação mais calórica, favorecem a ocorrência de obesidade, estresse e hipertensão arterial^[36].

O DM está envolvido tradicionalmente com um distúrbio metabólico na geração e conservação da energia e, mais recentemente, no metabolismo danificado do ácido graxos e no depósito de gordura ectópica que conduzem à resistência insulínica^[5].

Esta doença apresenta uma variedade de alterações bioquímicas, mas a fundamental é a redução da entrada de glicose nos tecidos periféricos e o aumento na liberação de glicose circulante pelo fígado^[37]. Antes de 1921, a principal causa de morte entre os pacientes diabéticos era a cetoacidose diabética. Entretanto, desde a descoberta da insulina, em 1921, a principal causa de morte entre os pacientes diabéticos envolve as alterações dos grandes e pequenos vasos sanguíneos^[38].

Conforme Boundy (2004), as causas do diabetes tipos I e II ainda não são totalmente conhecidas^[39] e fatores genéticos podem estar influenciando no desenvolvimento desta doença.

Os distúrbios auto-imunes e infecções virais estão apontados como fatores de risco para o DM tipo I. Outros fatores são:

- A obesidade, que contribui para a resistência à insulina endógena.

-O estresse fisiológico ou emocional, que pode causar elevação prolongada dos níveis dos hormônios do estresse (cortisol, epinefrina, glucagon e hormônio do crescimento) e em seguida aumentar a glicose sanguínea e acentuar as demandas impostas ao pâncreas.

-A gravidez, que causa ganho ponderal e aumenta os níveis do estrogênio e dos hormônios placentários.

-Alguns fármacos, incluindo diuréticos tiazídicos, corticóides supra-renais e anticoncepcionais orais, antagonizadores dos efeitos da insulina.

A exposição do organismo a níveis séricos elevados de glicemia durante anos é o fator de risco principal para o desenvolvimento de complicações crônicas, como doenças cardiovasculares e vasculares periféricas, retinopatia, nefropatia, dermatopatia diabética, neuropatia periférica e vasculopatia, sendo o controle rigoroso da glicose, em níveis normoglicêmicos de fundamental importância para retardar ou evitar as complicações secundárias do DM^[34, 39].

Em geral, a neuropatia periférica acomete as mãos e os pés e pode causar parestesia ou dor. A neuropatia autônoma evidencia-se de várias maneiras, incluindo-se gastroparesia (que retarda o esvaziamento gástrico e acarreta sensação de náuseas e plenitude pós-prandial), diarreia noturna, disfunção sexual e hipotensão postural^[39].

A hiperglicemia diminui a resistência do hospedeiro a infecções, porque a concentração de glicose na epiderme e na urina favorece o crescimento bacteriano. Por isso, o paciente é suscetível a infecções da pele e do trato urinário^[39]. Alguns autores acreditam que as complicações determinadas pelo DM em diversos tecidos podem ser causadas pelo estresse oxidativo, podendo-se incluir a alteração da condução nervosa, auto-oxidação da glicose sanguínea, formação de glicosilação avançada e um aumento da enzima aldose redutase^[40].

Diversos fatores podem estar envolvidos nos mecanismos responsáveis pelas alterações metabólicas decorrentes do DM e, a hiperglicemia se destaca como a principal alteração clínica, pois contribui para o aumento nas ligações da glicose circulante com as proteínas sanguíneas (principalmente a albumina), o qual é

denominada glicosilação não enzimática^[41], bem como com a auto-oxidação da glicose^[42, 43], conforme representado na FIGURA 1.

A contribuição do estresse oxidativo para o estabelecimento de um quadro de neuropatia periférica tem sido bem estabelecida por estudos realizados por Cameron *et al.* ^[44], que determinam que o estresse oxidativo causado pelo DM leva a uma diminuição do fluxo de sangue para a região endoneural, resultando em hipóxia para essa região. Este aumento na formação de EAO impede um adequado suporte neurotrófico e causa alteração no balanço intracelular, deficiência no aporte energético, culminando na diminuição do mecanismo de transporte iônico.

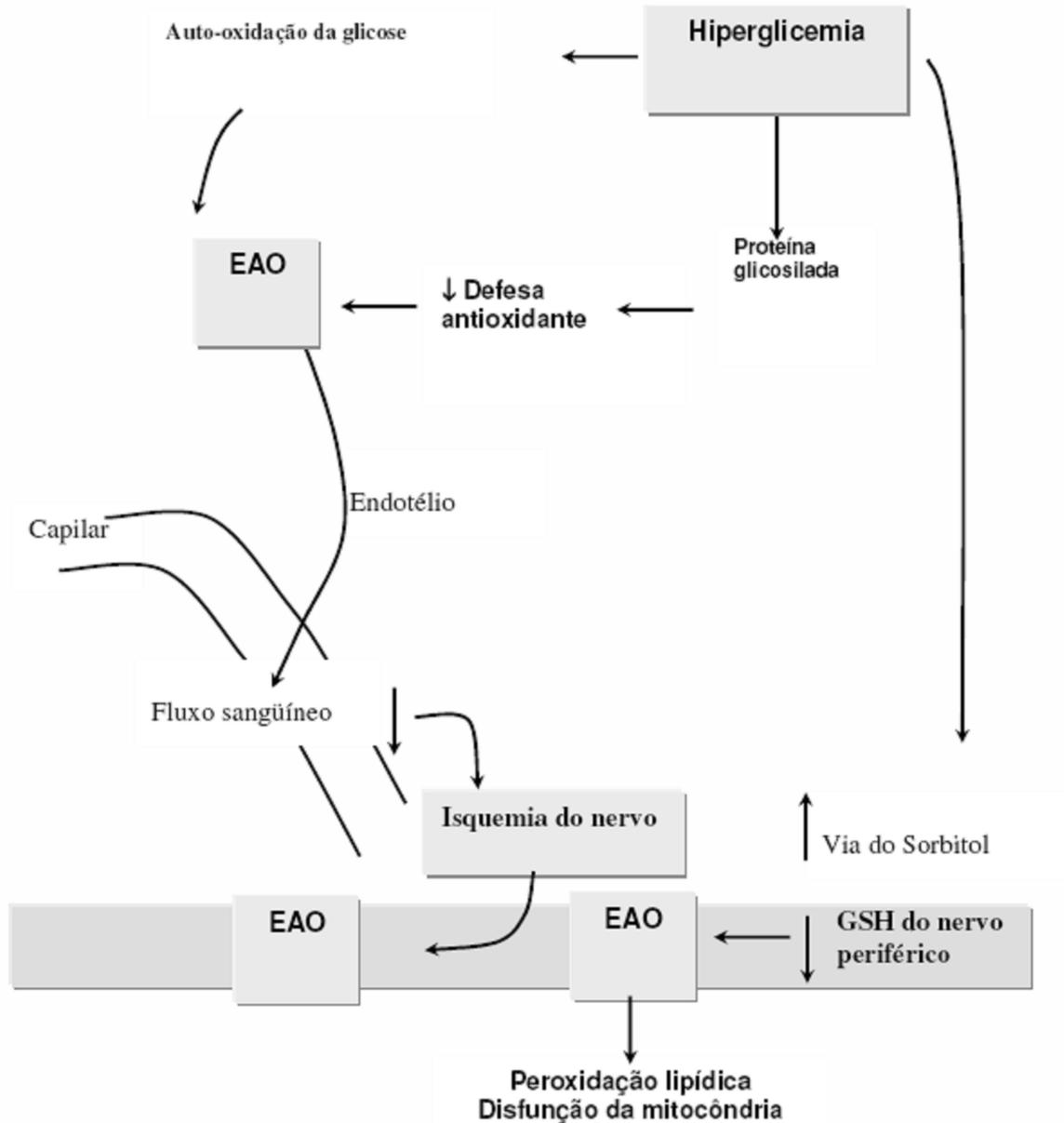


Figura 1. Efeito da hiperglicemia na formação da proteína glicosilada e da auto-oxidação da glicose, bem como a formação das espécies ativas de oxigênio (EAO) e o aumento da via do sorbitol. GSH-glutationa reduzida (adaptado de Van Dan^[45]).

A importância do DM do ponto de vista social e econômico é inegável, devido às altas taxas de morbidade, mortalidade e de incapacitação para o trabalho. Assim, fica evidente que tal doença merece atenção e cuidados especiais no sentido de uma detecção precoce dos indivíduos susceptíveis para que haja possibilidade de intervenção profilática nos mesmos^[46].

Desta forma, a utilização de modelos animais experimentais torna-se de grande valia para que o estudo no campo das doenças se difunda e possa colaborar

principalmente na prevenção do processo auto-imunológico^[47]. A utilização de modelos animais, que expressam a doença de forma similar ao verificado em humanos, proporciona um melhor entendimento da fisiopatologia, oferecendo oportunidades de pesquisa na formulação de novas modalidades terapêuticas.

1.2 Diabetes Mellitus Experimental

Grande parte dos conhecimentos científicos que o homem adquiriu na área da biomedicina visando, primordialmente, à saúde humana e à dos animais domésticos foi possível, em grande parte, graças ao uso dos animais de laboratório em suas pesquisas. Esta íntima relação entre pesquisa biomédica e uso de animais de laboratório se deve, principalmente, ao conhecimento científico adquirido a respeito destes animais^[48].

Animais de laboratório são definidos como aqueles criados e produzidos sob condições ideais e mantidos em ambiente controlado, com conhecimento e acompanhamento microbiológico e genético seguros, obtidos por monitoração regular^[49].

Após vários anos de pesquisa, foram criadas numerosas linhagens de animais co-sangüíneos e híbridos capazes de reproduzir as variáveis causadas por diferenças genéticas e, mais recentemente, os animais foram classificados quanto ao “status” sanitário ou ecológico, visando à prevenção de erros induzidos por diferenças ambientais^[49]. A padronização dos animais utilizados em pesquisa é indispensável, pois diminui o número de animais necessários para atingir a exatidão ou reprodutibilidade do experimento. Assim, o ambiente onde os animais são mantidos e/ou criados deve prevenir erros induzidos por diferenças ambientais, denominados padrão sanitário e, conseqüentemente, este deve ser definido conforme a relação dos animais com o seu ambiente^[50].

Diversos modelos animais foram utilizados no estudo do DM experimental e contribuíram para um melhor entendimento das causas, conseqüências e tratamentos da doença. No primeiro estudo, envolvendo animais e alterações metabólicas, foi removido o pâncreas de um cão e produzida uma condição clínica

semelhante à apresentada por humanos. O mesmo modelo foi empregado por Frederick Banting e Charles Best na Universidade de Toronto no ano de 1921, a partir do qual descobriram a insulina e realizaram os primeiros estudos em busca de uma terapêutica apropriada para tratar o DM^[51].

Considerando o DM pode ser transmitido geneticamente e pela demora na instalação das alterações fisiológicas, os modelos experimentais podem ser utilizados para aumentar a rapidez no desenvolvimento da doença^[19]. Atualmente é aceito que o DM tipo I se caracteriza pela destruição auto-imune das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção da insulina. A utilização de animais com DM auto-imune e, mais recentemente, o aparecimento de modelos experimentais transgênicos, que possuem a expressão imune para o desenvolvimento da doença, tem ajudado a esclarecer as condições moleculares favoráveis à ocorrência em humanos^[51].

Um dos principais problemas na geração do diabetes experimental em roedores foi resolvido há alguns anos com a utilização da *estreptozotocina*, atuante direto na indução da morte das células beta do pâncreas^[52].

A droga chamada estreptozotocina (STZ), é uma nitrosuréia isolada derivada da bactéria *Streptomyces griseus*. Essa, quando utilizada em animais, determina uma severa deficiência de insulina, verificando-se uma instalação imediata do quadro de hiperglicemia. As experiências evidenciaram que as doses de STZ (podendo variar de 50 a 100mg/kg de peso corporal) causam necrose das células beta e, o DM tipo I se desenvolve em um ou dois dias, após a aplicação da droga^[52].

Este achado foi confirmado em estudo experimental realizado por Melo^[53], que utilizou a STZ na indução do DM e ficou demonstrado que, 18 horas após a aplicação da droga, houve a indução do DM. O mecanismo de ação da STZ é semelhante ao de outra droga também utilizada para desenvolver o DM, o aloxano. Após a administração do aloxano ou da STZ, ocorre destruição das membranas celulares e indução de quebra no DNA, levando à ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintase e à depleção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)^[54]. Esta enzima está localizada no núcleo das células beta do pâncreas e necessita de NAD para realizar o reparo do DNA nuclear. Um aumento na sua atividade pode levar à

depleção do NAD intracelular, sendo impossível produzir insulina nas células beta do pâncreas.

Os fenômenos citados anteriormente podem ser prevenidos através da administração de nicotinamida e picolinamida, pois são substâncias que inibem a ação da poli (ADP-ribose) sintase, ocorrendo assim uma homeostase nos níveis de NAD intracelular e na produção de insulina^[55].

A formação de radicais livres parece ter implicação na destruição das células beta, pois enzimas que conseguem neutralizar a formação destes radicais, como a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), ao serem administradas em animais que receberam a estreptozotocina diminuíam os efeitos diabetogênicos determinados pela administração da droga^[56], conforme ilustrado na FIGURA 2.

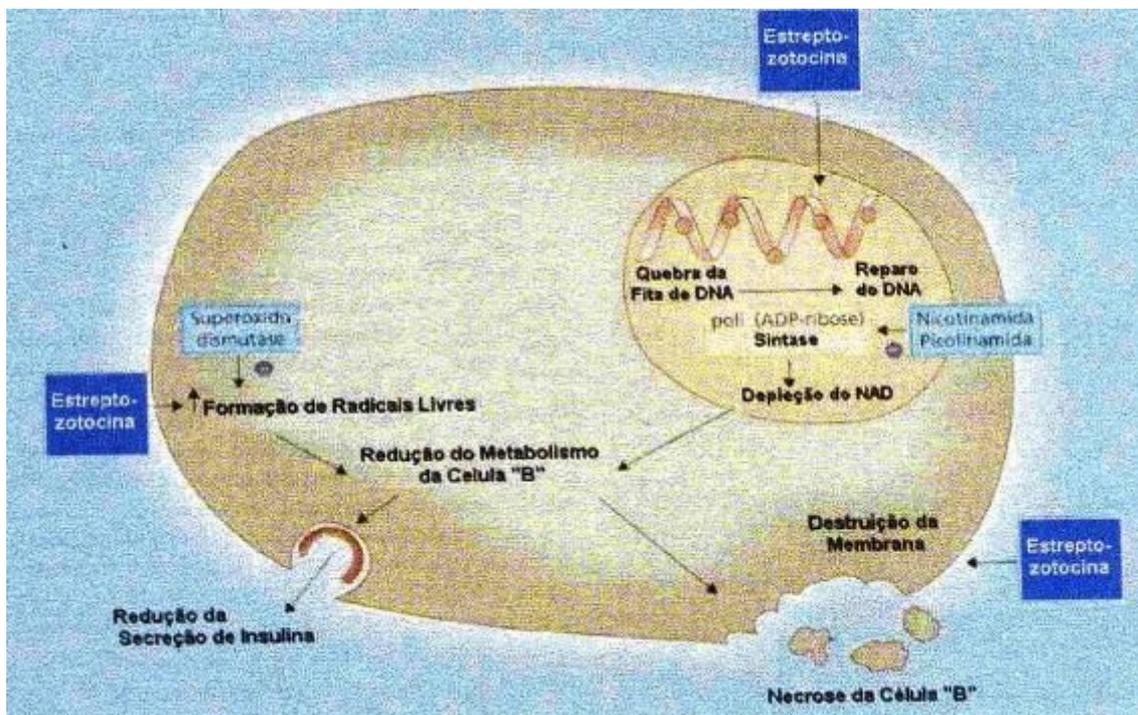


Figura 2. Atuação da estreptozotocina nas células pancreáticas beta (produtoras de insulina). Adaptado de Pickup e Williams^[51].

Like e Rossini desenvolveram o DM em camundongos após a aplicação de repetidas doses subdiabetogênicas de STZ (5mg/kg de peso corporal). As alterações decorrentes foram semelhantes às observadas em humanos, com grande

quantidade de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas, sugerindo uma resposta auto-imune, que influenciaria danos no DNA dos animais. A partir desses achados, iniciaram-se os estudos com as linhagens de animais geneticamente modificados para desenvolver o DM^[57].

Como o DM é considerado uma doença auto-imune, estudos recentes sugerem que as EAO podem participar na sua patogênese^[58].

1.3 Espécies Ativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

O elemento oxigênio (símbolo químico O) existe como uma molécula diatômica, O₂. Acima de 99% do O₂ na atmosfera é composta por isótopos de oxigênio-16, mas há traços de oxigênio-17 e oxigênio-18^[59].

Nos primórdios da Terra, os primeiros animais eram classificados como seres anaeróbicos, pois existia uma quantidade restrita de oxigênio na atmosfera. Os microorganismos anaeróbicos ainda sobrevivem nos dias atuais, mas o seu crescimento é inibido e podem ser freqüentemente destruídos quando expostos ao oxigênio (O₂) existente no ambiente (21%)^[4]. Os descendentes desses seres anaeróbicos são aqueles que conseguiram se "adaptar" ao aumento nos níveis atmosféricos de O₂. Entretanto, outros organismos tiveram seu processo de evolução envolvido com defesas antioxidantes para se protegerem da toxicidade do O₂^[37].

Exceto por algumas espécies anaeróbicas e aerotolerantes, todos os organismos requerem O₂ para produção eficiente de energia pelo uso da cadeia de transporte de elétrons que, por fim, doam elétrons para o O₂, como nas mitocôndrias de células eucarióticas e nas membranas celulares de muitas bactérias^[59].

Todos os seres vivos necessitam de energia para continuar vivos e manter um ambiente adequado para as células dos diversos tipos de tecido, mas, para que isso ocorra, deve existir uma adequada cadeia de reações químicas. O termo metabolismo se refere ao conjunto das reações químicas existentes dentro do corpo humano, cujos produtos são continuamente degradados e sintetizados para manter a célula viva^[37].

Para que o metabolismo celular ocorra, faz-se necessário o uso de energia derivada da oxidação dos nutrientes, a qual é dirigida para a formação de compostos fosfatados de alta energia, dentre eles o mais importante é o adenosina trifosfato (ATP). Assim, quando há necessidade de energia para a realização de exercícios, ela é fornecida quimicamente, em forma de ATP, através da hidrólise de ATP^[60]. Todavia, o metabolismo do oxigênio também gera uma série de subprodutos reativos e potencialmente tóxicos, conhecidos como radicais livres^[61].

No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos nos processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. Dessa forma, encontram-se relacionados com várias doenças, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, diabetes mellitus, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral^[62, 63].

As EAO se formam durante a redução do oxigênio à água na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. O termo denominado de radical livre é determinado quando uma espécie química, que pode ser um átomo, como o hidrogênio ou um átomo de cloro, um metal de transição ou uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital^[64]. O elétron não pareado neste orbital confere uma alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte tendência a adquirir um segundo elétron para este orbital. Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios, glicídios e ácidos nucleicos. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidados destas moléculas têm sido detectadas em pacientes com uma variedade de doenças^[65]. A estabilidade do radical livre é adquirida por remoção de elétrons de moléculas vizinhas, produzindo um par eletrônico.

A reatividade química dos radicais livres é determinada pela molécula que apresenta o elétron não pareado, podendo apresentar grande variedade nos diferentes tipos de radicais. A forma que expressa e compara a reatividade química é determinada pelo tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da espécie química, ou seja, um curto

tempo de meia vida indica uma alta reatividade, sendo que o radical hidroxil parece ser o mais reativo ^[4].

Nas membranas mitocondriais se encontram as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio à água durante o processo de respiração. A redução completa de uma molécula de oxigênio à água requer quatro sucessivas transferências de elétron, duas dessas, denominadas de redução univalente (FIGURA 3). Dois desses intermediários são chamados de radicais livres, são eles o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). A maior parte do oxigênio (aproximadamente 95%) recebe os quatro elétrons de uma só vez, através do sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos, denominados espécies ativas de oxigênio ^[66].

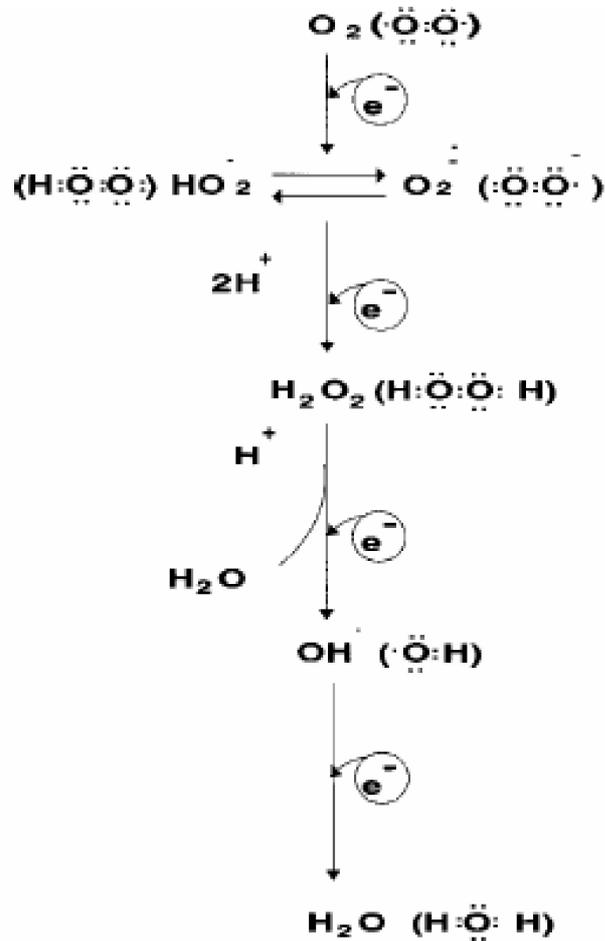


Figura 3. Redução do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Várias espécies ativas de O_2 são formadas no processo. (Adaptado de Cohen, MV.)^[67]

O radical OH^{\cdot} é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta, dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações^[62]. Essa espécie pode levar à injúria celular e de componentes estruturais do espaço extracelular.

O radical OH^{\cdot} é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante^[68]. O ferro reduzido (Fe^{2+}) desenvolve uma importante rota na geração de radicais tóxicos, particularmente quando reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2)^[69]. O radical hidroxil é formado quando o H_2O_2 reage com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), com catálise de íons divalentes de metais de transição como ferro e cobre, através da reação descrita por Haber-Weiss no ano de 1934^[4]. É

usualmente aceito que os efeitos tóxicos dos íons ferro são conseqüências da decomposição catalítica pelos íons Fe^{2+} do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos para a forma ativa do radical hidroxil, conforme reação (FIGURA 4):

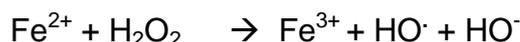


Figura 4. Decomposição catalítica pelos íons Fe^{2+} do peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos, com conseqüente formação de radicais hidroxil ($\text{OH}\cdot$)^[70].

Acredita-se que essas reações sejam o passo inicial de muitos processos de danos causados por radicais livres, como lipoperoxidação, modificação oxidativa de proteínas e lipoproteínas, e aumento de anomalias em cromossomos^[70].

A lipoperoxidação (LPO) é um processo natural de renovação das membranas celulares. Entretanto, o estresse oxidativo aumenta a LPO e provoca severo dano nas membranas celulares, promovendo aumento na fluidez da membrana e quebra das funções secretórias e dos gradientes iônicos. A reação de oxidação pode ser iniciada pelo radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) ou pelo H_2O_2 ^[71, 72].

Ao iniciar a lipoperoxidação, o radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (FIGURA 5). Como o átomo de hidrogênio possui um elétron, resta um elétron desemparelhado no átomo de carbono. Na fase de propagação, acontecem duas outras reações: 1) o carbono radical do lipídio poliinsaturado tende a se estabilizar por rearranjo molecular, produzindo dienos conjugados, os quais, por sua vez, rapidamente reagem com o oxigênio formando um radical peroxil; 2) o radical peroxil formado capta um próton de outra molécula de lipídio formando um hidroperóxido. Esta última reação torna a se repetir inúmeras vezes num processo de reação em cadeia. Na etapa final, dois radicais peroxil reagem entre si, formando um tetróxido instável que se decompõe, dando origem ao oxigênio singlete e a carbonilas excitadas, os quais podem emitir luz e serem medidos em detectores de quimiluminescência.

Uma etapa importante na degradação das membranas celulares é a reação das EAO com a dupla camada de ácidos graxos insaturados gerando hidroperóxidos lipídicos. Na quebra de tais hidroperóxidos, uma grande variedade de aldeídos pode ser formada^[73]. O malondialdeído (MDA), um tri-carbono composto pela cisão de ácidos graxos insaturados peroxidados, principalmente ácido aracdônico, é um dos principais produtos da peroxidação lipídica (lipoperoxidação)^[74].

Desde que o MDA em níveis elevados foi descoberto presente em várias doenças, também o foi relacionado aos danos por radical livre e usado extensamente como um índice de lipoperoxidação em ciências biológicas e médicas^[75].

O mais freqüente método usado para determinar essa formação de MDA em amostras biológicas é a espectrofotometria, após a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA)^[76]. Entretanto, o TBA não reage somente com o MDA, mas com muitos outros compostos de origem biológica, porém, a derivatização do MDA com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) está sendo empregada para permitir uma determinação mais específica deste composto, especialmente se combinado com sua separação, usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)^[77-79].

Os efeitos da lipoperoxidação sobre as biomembranas podem ser classificadas em quatro grupos:

- mudanças no micro ambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana e nos canais iônicos e receptores, ativando ou inibindo a atividade dessas proteínas;
- formação de novos canais de permeabilidade;
- formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente;
- oxidação dos grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, ocasionando perda de suas funções.

Halliwell e Gutteridge definem a lipoperoxidação (LPO) como sendo uma deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados, ou seja, lipídios que contêm, no mínimo, dois carbonos unidos por ligações covalentes duplas^[4]. As membranas das

células e das organelas são mais suscetíveis a LPO, pois contêm grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Assim, o processo de lipoperoxidação envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, o consumo de oxigênio e determina um rearranjo das duplas ligações nos lipídios. A eventual destruição dos lipídios da membrana, produz uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres (FIGURA 5)^[80].

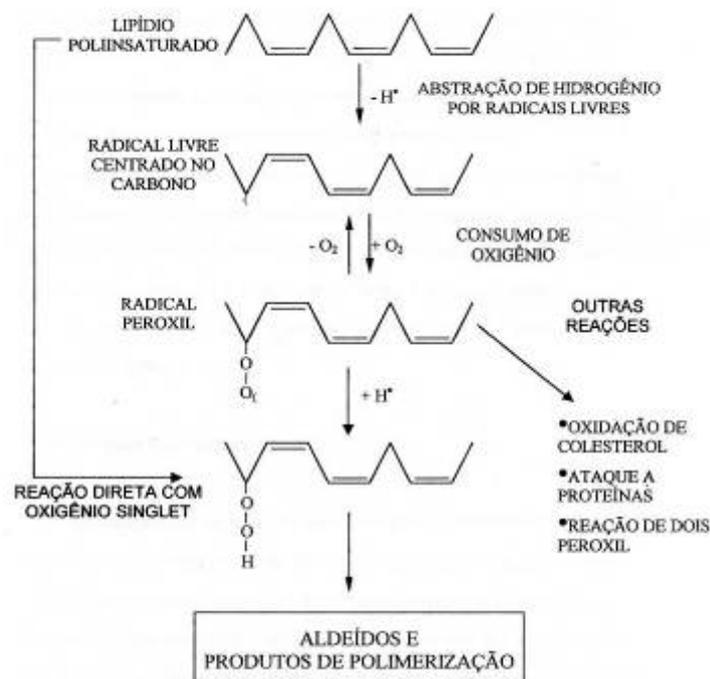


Figura 5. Representação esquemática da reação da LPO (modificado de Halliwell, 1999)^[4]

Junto com as alterações de permeabilidade da membrana pode haver um acúmulo de cálcio intracelular, o que ativaria outras enzimas cálcio-dependentes, como a fosfolipase, ocasionando um ciclo vicioso. Além de ativar outras enzimas, há um aumento na síntese de prostaglandinas, leucotrienos e fagocitose, o que pode gerar aumento na destruição das membranas celulares^[81].

Como mecanismo compensador do processo oxidativo, o organismo possui um sistema antioxidante, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Existem, também, as defesas secundárias que

impedem a propagação da LPO e as terciárias, enzimas responsáveis pelo reparo de danos já instalados^[4, 82].

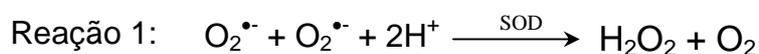
Quando a substância age neutralizando as EAO, na fase de iniciação ou propagação da LPO, levando à formação de um composto menos reativo, é chamada de "scavenger". Ao passo que, se a substância antioxidante tiver a propriedade de absorver a energia de excitação dos radicais, neutralizando-os, é denominada de "quencher"^[4, 82, 83].

A distribuição das enzimas antioxidantes está intimamente relacionada com as fontes de EAO, sendo assim, podemos notar a importância da existência das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Sem elas, o equilíbrio celular seria alterado e facilitaria o surgimento de várias disfunções que poderiam levar a sérios processos de doença.

A regulação das enzimas antioxidantes, necessária para manutenção da homeostase celular em condições adversas ao organismo, depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores^[84].

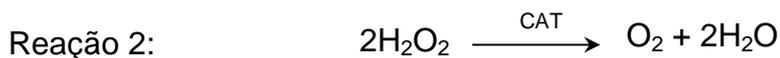
O sistema enzimático encarregado da detoxificação das EAO é formado por várias enzimas, das quais se podem destacar: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx).

A SOD forma um grupo de enzimas, que catalisa a reação de dois ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$), com conseqüente formação de peróxido de hidrogênio, sendo menos reativo e podendo ser degradado por outras enzimas^[85].

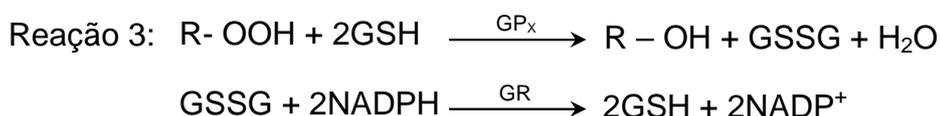


A SOD é classificada em três tipos distintos: SOD cobre e zinco (CuZnSOD), presente no citoplasma das células de eucariontes; SOD manganês (MnSOD), localizada na matriz mitocondrial e SOD ferro (FeSOD), que ocorre em bactérias^[85].

Outra enzima importante é a CAT. O peróxido de hidrogênio, formado na dismutação do ânion superóxido, é transformado em água e oxigênio por ação dessa enzima. Esta, por sua vez, tem uma ação muito específica, já que atua em reações com peróxidos de hidrogênio, metila e etila ^[86].



Entre as peroxidases, que geralmente usam o grupo heme, se sobressai a atividade da glutathiona peroxidase (GP_x), localizada no citosol e na matriz mitocondrial. Ela catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e do hidroperóxidos orgânicos, através da oxidação da glutathiona reduzida (GSH), que será por sua vez, regenerada por ação da glutathiona redutase com consumo de NADPH. Neste processo de oxirredução, os grupamentos sulfidrilas doam dois hidrogênios para os peróxidos, transformando-os em álcool e/ou água, formando glutathiona dissulfeto (GSSG) ^[4, 85].



Muitas plantas são citadas quanto aos seus efeitos antioxidativos, ou seja, são capazes de proteger a célula ou tecidos de danos decorrentes de radicais livres ou de lipoperoxidação. Entre os grupos de compostos vegetais que apresentam essa capacidade estão os flavonóides, que são representados pela rutina e quercetina, entre outras ^[12]. Esses flavonóides atuam em atividades antilipoperoxidativas, antitumorais, antiinflamatória e antiplaquetária, assim como podem atuar como um pró-oxidante ^[10, 87]. Existem indícios que a forma como um flavonóide responde ora como um antioxidante ou como pró-oxidante, está intimamente ligada a concentração e a fonte do radical livre ^[10].

Assim como alguns trabalhos experimentais, utilizando quercetina, obtiveram redução das lesões em tecidos, diminuição da peroxidação lipídica e menor quantidade de colágeno, amenizando a fibrose ^[11], outros demonstram atividade pró-oxidativa quando o metal de transição era avaliado. Esses mesmos autores questionam: se o comportamento ambíguo ocorreria em outras formas de antioxidantes, ou seja esse fato é exclusivo para flavonóides. Nos últimos anos,

vários fitoterápicos estão sendo investigados quanto a sua capacidade anti ou pró-oxidativa, ação protetora ao dano da membrana lipídica celular e a atividade mutagênica^[88].

Essas investigações são necessárias para discutir os mecanismos dos efeitos dos antioxidantes e sua capacidade de interação com as membranas, esclarecendo pontos ainda obscuros para a interface clínico-terapêutica.

1.4 Diabetes Mellitus e o Estresse Oxidativo

No Diabetes Mellitus existem consideráveis evidências de que o dano oxidativo está aumentado, embora seu mecanismo ainda não esteja muito claro^[89]. Uma das teorias é a de que o aumento da concentração de açúcares no organismo causaria a glicosilação de macromoléculas, o qual leva a uma modificação não enzimática destas, diminuindo sua função biológica. Nesse processo são gerados EAO que agirão por todo organismo promovendo o dano oxidativo^[90].

As principais mudanças metabólicas causadas pela hiperglicemia são os aumentos no fluxo de glicose na via poliol, que leva a formação crescente de radicais livres de oxigênio e a formação de produtos finais do processo de glicação como a carboximetilisina, uma proteína do cristalino^[91]. Existem também evidências que a glicação por si só pode induzir a formação de radicais livres derivados de oxigênio em eritrócitos de indivíduos diabéticos^[92].

Verificam-se relatos de aumento do estresse oxidativo no estômago e no fígado dos animais diabéticos, bem como de alteração no fluxo sanguíneo da artéria mesentérica superior que é influenciada pelo tempo de instalação da doença e pelo aumento da glicose sanguínea^[93]. Foi sugerido que, no DM, o estresse oxidativo é a chave na patogênese das complicações vasculares, tanto microvascularmente como macrovascularmente, e um marcador desses danos é uma disfunção endotelial. Entretanto, a rota do estresse oxidativo é muito questionada por estudos de intervenção com antioxidantes, que são em muitos casos mal sucedidos^[94].

A perda da atividade dos antioxidantes é realçada sensivelmente pelo estresse oxidativo associado com EAO intracelulares. A hiperglicemia induzida produz um

aumento de superóxidos inibindo a glicose-6-fosfatase dehidrogenase, uma enzima taxa-limitadora da via pentose que é requisito para fornecer reduções equivalentes para o sistema de defesa antioxidante e é requisito para formação do sistema glutaciona peroxidase – glutaciona redutase. Adicionalmente, o sorbitol é metabolizado em frutose via sorbitol dehidrogenase, aumentando a relação NADH/NAD⁺. Este, promove o aumento da síntese de Diaglicerol (DAG) que ativa a proteína quinase C, responsável por severas complicações patológicas do DM^[94].

Sendo assim, a hiperglicemia promove um aumento na formação de EAO, presumivelmente derivadas da cadeia respiratória mitocondrial. A ação das EAO tem uma rota central mediada por vários defeitos metabólicos associados com o estado diabético. Conseqüentemente, a inibição da produção de EAO e/ou aumento da varredura das EAO poderia ser uma forma terapêutica benéfica^[95].

1.5 *Croton cajucara* BENTH

Os usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas, que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos, envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial ^[15].

O gênero *Croton*, pela classificação taxonômica, pertence à ordem Euphorbiales da subfamília Crotonoideae que é um dos gêneros mais numerosos da família Euphorbiaceae, possuindo representantes tanto medicinais, quanto tóxicos ^[96, 97]. No Brasil, há mais de 300 das 700 espécies existentes desse gênero, muitas das quais, têm suas propriedades químicas e/ou farmacológicas já conhecidas ^[15].

O *Croton cajucara* BENTH distribui-se nas regiões Leste e Central da floresta Amazônica, principalmente no Pará, junto ao estuário do Rio Amazonas, assim como também no estado do Amapá. Já, no próprio estado do Amazonas, só é encontrado em plantações cultivadas^[98].

O CcB, de nome popular Sacaca, é uma planta arbustiva de casca purulenta, folhas alternas, lanceoladas, olentes. As Euphorbiaceas têm importância na medicina como fonte de toxinas e medicamentos. Resinas e diterpenos do croton são usados em estudos experimentais de iniciação de tumores e podem ser úteis na terapia do câncer. Devido à diversidade bioquímica da família, parece provável que usos medicinais adicionais podem ser descobertos, uma vez que muitas pessoas na América, Ásia e África utilizam essas plantas para diversos males. Algumas espécies de croton são usadas como cicatrizante e antiinflamatório; para doenças do aparelho digestivo, como antiviral, como antimicrobiano e antitumoral^[99, 100].

No estado do Pará, as folhas e cascas do caule dessa planta são utilizados em forma de chá ou pílulas no combate a diabetes, diarreia, malária, febre, distúrbios gastrintestinais, renais, hepáticos e no controle de níveis elevados de colesterol^[14, 15, 101].

A Sacaca também é comercializada em farmácias de manipulação e neste caso o pó das cascas do caule é vendido em cápsulas (concentração aproximada de 250mg). Já, as folhas são comercializadas livremente, para distúrbios do fígado e auxílio na digestão de alimentos gordurosos. O pó das folhas é vendido também em farmácias de manipulação, com indicação, além das anteriores, como ação hepatoprotetora e para dietas de emagrecimento^[15, 102, 103].

A Sacaca é considerada uma planta de crescimento secundário, aparecendo em clareiras recentes e terras abandonadas. Apesar de ser encontrada nas várzeas alagadas, parece preferir as várzeas altas, mais protegidas de alagamentos constantes. É uma árvore resistente a pragas e que não necessita de solos ricos, adaptando-se bem até aos solos de argila amarela, de fertilidade muito baixa, perto de Manaus^[15, 103].

É uma árvore de 6 a 10 m de altura, de copa estreita e casca aromática e pulverulenta. As folhas são simples, subcoriáceas, lisas na superfície superior, de 7 a 16 cm de comprimento (FIGURAS 6, 7 e 8)^[104].

Sua inflorescência, em racemos terminais com 9 cm de comprimento, apresenta-se com 7 flores femininas na base e 12 masculinas na porção mediana terminal, de cor amarelada. Já os frutos são cápsulas globosas de um pouco menos de 1 cm de

comprimento, com uma semente preta em cada carpelo. A planta multiplica-se apenas por sementes^[104].

A colheita da sacaca consiste na extração das folhas da árvore, normalmente realizada a cada 3 meses, já que a planta é sensível demais ao sol forte para permitir um período maior de desfolhagem. Fazendeiros locais preferem colher as folhas velhas e mesmo amareladas por acreditarem que possuem melhores propriedades medicinais (informação não confirmada cientificamente). Uma planta de 4 anos produz 10 quilos de folhas por ano^[104].



Figura 6. Vista geral da planta *Croton cajucara* BENTH em seu ambiente natural^[105].



Figura 7. Vista geral das folhas de *Croton cajucara* BENTH ^[104].



Figura 8. Cascas do caule do *Croton cajucara* BENTH ^[105].

Em alguns países de clima tropical como o Brasil, a abundância de plantas medicinais oferece acesso a diversos produtos utilizados, através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças. Além disso, a utilização de plantas como meio curativo, é uma atividade altamente difundida e popular, às vezes, empregada de maneira equivocada e até mesmo malévola, afinal muitas plantas possuem princípios tóxicos e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas ^[104].

Inúmeros casos de hepatite tóxica foram notificados em hospitais públicos da região Amazônica devido ao uso prolongado dessa planta ^[15]. A disseminação de uso tem chegado a lugares distantes no país, como em nosso estado, na cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, onde também houve relatos de casos de hepatite fulminante, conforme comunicação pessoal do Dr. Milton Bertelli, médico Gastroenterologista Hepatologista e professor da Universidade de Caxias do Sul, que nos motivou neste estudo.

Os extratos de plantas, praticamente todas as que contêm bioflavonóides, apresentam uma significativa ação antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados por radicais livres e, conseqüentemente, o surgimento das doenças associadas a eles.

Em estudos fitoquímicos, ao investigarem partes distintas da planta *Croton cajucara* BENTH como raiz, casca do caule e folhas, verificaram que: a) a casca apresentou-se rica em clerodanos do tipo diterpenos: *trans*-dehidrocrotonina (DCTN) (FIGURA 9), *trans*-crotonina (CTN) (FIGURA 9), *cis*-cajucarina B e sacararina; b) nas plantas jovens (até 18 meses) o triterpeno ácido acetil aleuritólico (AAA) (FIGURA 9) se apresenta em maior concentração na casca do caule; c) o diterpeno CTN não está presente, onde o DCTN se encontra em alta concentração (1,4% em casca seca), detectado em plantas adultas com idade de 4 a 6 anos, enquanto plantas com 3 anos de idade tem somente 0,26% de diterpenos [106].

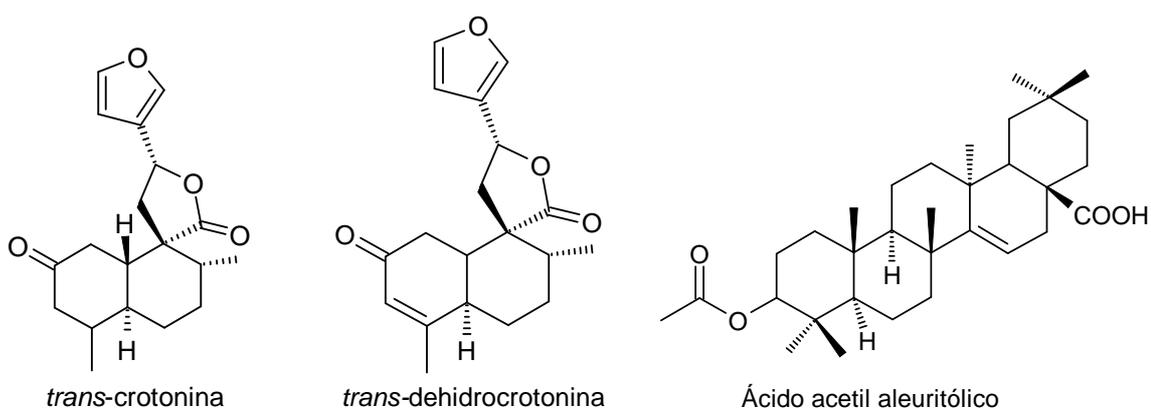


Figura 9. Componentes da raiz, casca e folhas do *Croton Cajucara* BENTH [15].

A atividade farmacológica do maior componente do extrato da casca (DCTN) tem sido extensivamente estudada sendo que foram detectados efeitos antiinflamatório, analgésico, antiulcerogênico, hipoglicêmico e hipolipidêmico [107]. O chá da casca de CcB produziu redução na glicose plasmática, com diminuição de peso corporal, sugerindo uma atividade hipoglicêmica desta espécie [108].

Em estudos realizados com as folhas do CcB foi possível isolar e caracterizar três esteróides (β -sitosterol, estigmasterol e 3,0-glicopiranosil- β -sitosterol), dois

flavonóides (3,7,4-tri-*o*-metilcanferol e 3,7-di-*o*-metilcanferol) e um diterpeno do tipo 19-*nor*-clerodano (cajucarinolida) (FIGURA 10) [15, 103].

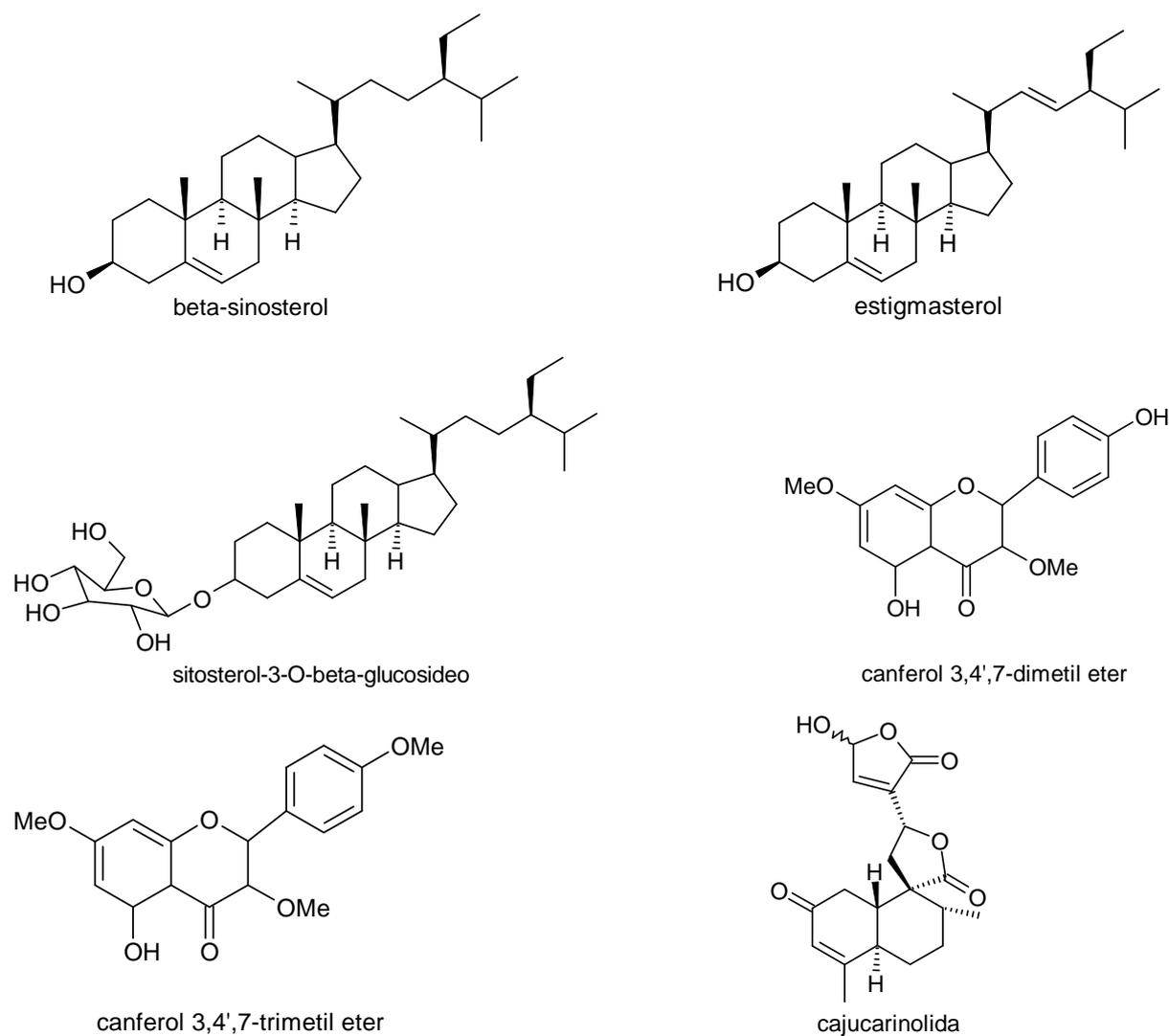


Figura 10. Substâncias isoladas da folha do *Croton Cajucara BENTH* [15].

Essas substâncias foram submetidas à avaliação de atividade antiinflamatória e antiálgica e, para tanto, diversos testes foram feitos, comprovando que os compostos *t*-CTN e AAA agem inibindo diferentes compostos inflamatórios, demonstrando terem afinidade pelos mecanismos das prostaglandinas e da histamina^[108].

Cavalcante e colaboradores^[109], comprovaram a eficácia hipoglicêmica e hipolipidêmica da sacaca em ratos. Em 1995, Oliveira e cols.^[110], confirmaram o efeito hipolipidêmico em coelhos. Com relação aos estudos fitoquímicos, o óleo

essencial das folhas foi avaliado por Araújo e cols. em 1971^[111] e, mais recentemente, por Lopes e cols. em 1999^[112].

Outras atividades farmacológicas do CcB já foram evidenciadas, das quais pode-se citar a atividade antinociceptiva dos extratos hexânicos, clorofórmico e metanólico das folhas^[108] e o efeito hipolipidêmico, correlacionado com a redução de índices elevados de colesterol, foi evidenciado no extrato hidroalcoólico das folhas^[113]. Também foi verificado que o extrato hidroalcoólico das folhas não produziu toxicidade em camundongos tratados oralmente com até 5g/kg (toxicidade aguda)^[113].

Trabalhos demonstram que a administração oral de trans-desidrocrotonina é efetiva em reduzir a hiperlipidemia induzida por uma dieta rica em gordura ou por tiloxapol em camundongos, como também na hipertrigliceremia induzida por etanol e sugere seu uso benéfico como um agente antiaterogênico^[114, 115]. Em ratos diabéticos induzidos pelo uso da estreptozotocina (STZ), a t-DCTN demonstrou atividade antidiabética oral. O efeito hipoglicemiante da t-DCTN é maior quando administrada uma hora antes da estreptozotocina (efeito preventivo). Quando a t-DCTN foi administrada 48 horas após a STZ (efeito curativo), os níveis de glicose sanguínea caíram em torno de 49 %^[116].

Em muitos casos, a pesquisa nasceu da experiência tradicional e sabedoria popular e, a partir daí, os mecanismos e vias de ação destas plantas, foram sendo descobertos, confirmando, nos estudos clínicos, a eficácia terapêutica de certas plantas ou extratos derivados de plantas. Por outro lado, as formulações a base de plantas medicinais também são importantes fontes de danos hepáticos *in vivo*, o que não é surpresa, já que o fígado é predominantemente um local de “clearance”, biotransformação e excreção de drogas^[117].

A busca por substâncias antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos, por isso que cada vez mais os grandes centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas têm investido neste tipo de pesquisa^[118], porém suas ações antioxidantes exigem maiores estudos e comprovações com técnicas apuradas e confiáveis.

1.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Muitas metodologias podem determinar a concentração de radicais livres e EAO em ensaios laboratoriais. Estas são empregadas para avaliação do dano tecidual provocado pela peroxidação lipídica que está implicada em diversas doenças, incluindo o Diabetes Mellitus, arterosclerose, câncer, doença de Parkinson, entre outras^[16]. A quantificação de malondialdeído (MDA), um dos principais produtos formados pelo processo oxidativo de hidroperóxidos lipídicos, por HPLC é recomendada devido a sua alta sensibilidade analítica e sua especificidade, especialmente em estudos de lipoperoxidação^[16].

Também, a testagem farmacológica, chamada de “screening biológico”, envolvendo a observação dos efeitos induzidos pelos extratos de plantas ou pelos compostos purificados destes extratos em modelos *in vitro*, seguida por uma análise mais detalhada da sua atividade^[119] emprega a cromatografia líquida de alta eficiência como uma de suas metodologias.

A cromatografia é definida como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são divididos entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes^[120, 121].

A cromatografia líquida em coluna se divide em dois grupos: 1) a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com fluxo da fase móvel devido à força da gravidade e 2) a cromatografia líquida de alta eficiência ou em inglês “high performance liquid chromatography” (HPLC), que usa colunas e uma pressão da fase móvel elevada, obtida com auxílio de uma bomba de alta pressão que pode empurrar a fase móvel com vazão mais rápida^[122].

A técnica de HPLC utiliza instrumentos muito sofisticados que podem ser totalmente automatizados. É um tipo de cromatografia líquida que emprega

pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade^[17].

A cromatografia tem cerca de 100 anos e ela tem se mostrado uma técnica incrivelmente importante para a análise de materiais com as mais variadas estruturas e propriedades físicas. Três cientistas ganharam o Prêmio Nobel devido a seus trabalhos na área de cromatografia (Tiselius em 1948, e Martin e Synge em 1952).

A HPLC é uma técnica que atualmente emprega um conjunto de equipamentos especiais. Eles se caracterizam por terem os seguintes componentes: 1) Reservatório e sistemas de bombeamento da fase móvel; 2) Sistema de introdução de amostra; 3) Sistema analítico (coluna cromatográfica); 4) Sistema de detecção; 5) Sistema de registro e tratamento de dados. A fase móvel é bombeada por ação de uma bomba, do seu reservatório para a coluna cromatográfica, passando antes por uma pré-coluna. A amostra é introduzida no alto da pré-coluna e o eluente é continuamente observado por um detector, podendo, em seguida, passar para um coletor de frações. Ao sair da coluna, passa por um sistema de detecção, onde são detectadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada num sinal elétrico, que é convenientemente registrado e tratado matematicamente por um processador conveniente^[123].

A partir dos anos 70 foram desenvolvidos aparelhos mais sofisticados, que levaram a uma maior resolução e mais alta separação cromatográfica. Assim tornou-se possível uma melhor detecção da maioria dos compostos e a análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, entre outras. Dificuldades anteriores ou separações de compostos como corantes polares, isômeros, drogas básicas e seus metabólitos viraram mera rotina^[123].

A grande reprodutibilidade na HPLC eleva ambas as análises (tanto qualitativa, quanto quantitativa), a um alto nível de exatidão e precisão. As múltiplas vantagens da HPLC fizeram desta técnica analítica uma das mais procuradas atualmente. As

vantagens mais importantes da HPLC são, a sua resolução e a rapidez da análise^[123]. A necessidade de experiência no seu manuseio é um fator limitante, pois para um operador atingir este nível de vivência necessita em geral 6 meses de treinamento^[17].

A fase móvel empregada em HPLC deve ser de alto grau de pureza, normalmente chamada de “grau HPLC”. Eles devem circular por tubos que conectam o reservatório do solvente com a bomba, a bomba ao injetor, este com um ou mais detectores e, eventualmente, com um coletor de frações ou válvulas de distribuição. Estes tubos devem ser inertes e de acordo com o sistema cromatográfico feito de aço inoxidável teflon ou outros polímeros, resistindo assim a altas pressões^[123].

A HPLC pode ser efetuada mantendo-se a composição da fase móvel constante durante toda a análise cromatográfica. Nesse caso fala-se em HPLC isocrático. Em outras oportunidades, por necessidade do sistema que está sendo analisado, é conveniente alterar durante a análise cromatográfica, a composição da fase móvel. Neste caso fala-se em HPLC com programação por gradiente^[123].

As separações cromatográficas produzem-se por um balanço de afinidades entre a amostra, a fase móvel e a fase estacionária (coluna cromatográfica). As propriedades químicas da fase móvel são as que estabelecem o tipo e a força de interação entre o solvente e a amostra, e em consequência, são determinantes na separação^[120].

O resultado de um ensaio cromatográfico é, por um lado, a obtenção de frações separadas dos componentes da amostra, e por outro lado, a de um gráfico chamado cromatograma, de cuja interpretação podem extrair-se conclusões qualitativas e quantitativas. Este registro e a eventual manipulação se obtêm a partir do sinal proveniente do detector por meio de um sistema de aquisição e processamento de dados^[121].

Inúmeros métodos vêm sendo aplicados para determinação do potencial antioxidante de compostos em ensaios laboratoriais^[16], e a tecnologia que está cada vez mais incorporada às rotinas científicas, devido à sua apurada sensibilidade e eficiência, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência^[17]. Bem como, na quantificação de malondialdeído (MDA), um dos principais produtos formados pelo

processo de estresse oxidativo em hidroperóxidos lipídicos^[124], o HPLC é recomendada devido a sua alta sensibilidade analítica e sua especificidade, especialmente em estudos de peroxidação lipídica em amostras humanas^[16]. Também, na análise quantitativa de espécies reativas de oxigênio e dos mecanismos antioxidantes, a HPLC vem demonstrando resultados primorosos e efetivos.

1.7 Levedura *Saccharomyces cerevisiae* como Modelo de Estudo

Ensaio microbianos *in vitro* têm se mostrado muito adequados na triagem rotineira de vários produtos naturais, sendo testes rápidos, sensíveis, econômicos, reprodutíveis e apresentam resultados confiáveis na identificação da atividade biológica. São utilizados e recomendados por conceituadas entidades governamentais e órgãos de pesquisa dos Estados Unidos, Canadá e vários países da Europa^[125].

O fato de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ser um dos microorganismos mais estudados do ponto de vista genético e metabólico, levou-a a se tornar um dos microorganismos mais utilizados em testes biológicos^[126, 127]. A capacidade que a levedura apresenta de crescer em condições aeróbicas e anaeróbicas permite, também, o estudo durante diferentes situações metabólicas. Os dados obtidos nesse tipo de teste apresentam uma correlação de aproximadamente 70% em relação ao observado no homem^[125].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular, com ciclo eucarioto típico e completo, amplamente estudado e notavelmente semelhante às células de mamíferos no que se referem às macromoléculas, organelas e proteínas com homologia às proteínas humanas, tornando-a uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese, reparo de DNA e mecanismos que respondem ao estresse oxidativo^[126, 128].

As leveduras podem crescer tanto em condições anaeróbicas quanto aeróbicas e, portanto, são expostas continuamente as EAOs geradas como bioprodutos do metabolismo. A *Saccharomyces cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras

anaeróbias facultativas. Isto significa que fermenta hexoses como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio. A glicose é a principal fonte de carbono da *Saccharomyces cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecido como repressão da glicose ou repressão catabólica [129, 130]. Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2% no meio, há a desrepressão das enzimas que participam da biossíntese na mitocôndria e de outros genes necessários para o crescimento respiratório [129, 130].

Este crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (FIGURA 11). Após um breve período de adaptação em meio rico (YPD – 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes [131, 132].

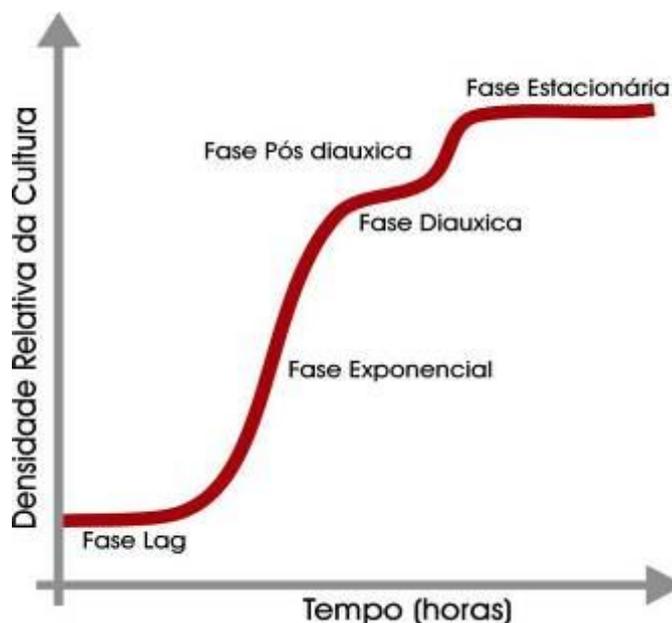


Figura 11. Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (Adaptado de Fuge e Werner, 1997) ^[132].

1.7.1 Defesas antioxidantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma variedade de mecanismos de defesas antioxidantes. Possui duas enzimas superóxidos dismutases: SodCuZn, codificada pelo gene SOD1, localizada no citoplasma; e a SodMn, codificada no núcleo pelo gene SOD2 e que é localizada na mitocôndria ^[133, 134]. Ambas as enzimas fazem a dismutação do radical superóxido a peróxido de hidrogênio. Duas catalases foram identificadas, uma citosólica codificada pelo gene CTT1 e outra perioxossomal codificada pelo gene CTA1. As leveduras mutadas para ambas as catalases são sensíveis a estresse por elevadas concentrações de H₂O₂ ^[135].

Linhagens isogênicas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox da célula ^[136, 137]. Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de defesa antioxidante. Pode-se também combinar um oxidante conhecido, como H₂O₂, t-BOOH (peróxido de terc-butil) e paraquat, com uma substância com potencial antioxidante. O aumento da viabilidade celular ao tratamento estará

sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (pró-oxidante) ^[138-140].

Tendo em vista as considerações postuladas com esse trabalho, pretendeu-se avaliar a ação do *Croton cajucara* BENTH em animais diabéticos e avaliar seu potencial antioxidante por HPLC e sobre a levedura de *Saccharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial antioxidante e os efeitos da administração do extrato aquoso da casca (EAC) do caule da planta amazônica *Croton cajucara* BENTH sobre o estresse oxidativo no modelo experimental de Diabetes Melittus.

2.2 Objetivos Específicos

-Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* do extrato aquoso da casca do caule de *Croton cajucara* BENTH com o método a base da enzima Xantina Oxidase, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

-Determinar a atividade antioxidante *in vivo* do EAC do caule de *Croton cajucara* BENTH, utilizando diferentes linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* selvagens e isogênicas, deficientes em produtos de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo.

-Comparar o peso corporal, os níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos dos diversos grupos animais com e sem o uso de EAC de CcB em diferentes tempos do tratamento.

-Verificar as funções de integridade hepáticas através da atividade das aminotransferases AST (aspartato-aminotransferase), ALT (alanina-

aminotransferase) e da FA (Fosfatase Alcalina) no plasma dos animais, indicadores de dano hepático.

- Desenvolver, adaptando e implantando a metodologia para medir MDA (malondialdeído), via HPLC, em homogeneizados de fígado dos animais estudados, avaliando esse marcador de estresse oxidativo.

- Quantificar a atividade da enzima antioxidante Glutathione Peroxidase (GPx) no fígado dos animais dos diversos grupos do estudo.

MATERAIS E MÉTODOS



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento da Pesquisa

Este estudo de caráter experimental quantitativo, empregou ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina, tratados com extrato aquoso da casca (EAC) do caule da planta amazônica *Croton cajucara* BENTH.

3.2 Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso médio no início dos experimentos de 250 a 300g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os animais foram mantidos durante o experimento na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas plásticas individuais, de 47x34x18cm, forradas com maravalha.

Os animais foram tratados diariamente com água e ração Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil) *ad libitum* composta por: 15,4% de proteína, 2,9% de gordura, 60,5% de carboidratos, 3,9% de fibras, 5,3% de minerais e 12% de água. As caixas foram limpas de acordo com a rotina do Centro de Pesquisa, sendo mantidos em uma temperatura de $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$, em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas).

3.3 Considerações Bioéticas

Todos os procedimentos realizados seguiram em consonância com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde contidas na Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais, de autoria do grupo de pesquisa e de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)^[141] bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals* (NAS).

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o protocolo número 04-453.

3.4 Delineamento Experimental

O tempo de duração do experimento foi de 60 dias, a partir do dia da indução do DM experimental, onde foram formados 6 grupos de animais. O número total em cada grupo no final do estudo foi estabelecido pela sobrevivência dos animais.

1) Grupo controle (CO): estes animais normais receberam 1,5mL de água destilada intragastricamente, diariamente, durante os últimos 20 dias (n=10).

2) Grupo controle + CcB 5 dias (CO5d): estes animais normais receberam 1,5mL de extrato aquoso da casca do caule de *Croton cajucara* BENTH (concentração de 5%, intragastricamente), diariamente, durante os últimos 5 dias (n=10).

3) Grupo controle + CcB 20 dias (CO20d): estes animais normais receberam 1,5mL de extrato aquoso da casca de *Croton cajucara* BENTH (concentração de 5%, intragastricamente), diariamente, durante os últimos 20 dias (n=10).

4) Grupo diabético (DM): estes animais diabéticos receberam 1,5mL de água destilada intragastricamente, diariamente, durante os últimos 20 dias (n=10).

5) Grupo diabético + CcB 5 dias (DM5d): estes animais diabéticos receberam 1,5mL de extrato aquoso da casca do caule de *Croton cajucara* BENTH (concentração de 5%, intragastricamente), diariamente, durante os últimos 5 dias (n=10).

6) Grupo diabético + CcB 20 dias (DM20d): estes animais diabéticos receberam 1,5mL de extrato aquoso da casca do caule de *Croton cajucara* BENTH (concentração de 5%, intragastricamente), diariamente, durante os últimos 20 dias (n=10), que passaremos a denominar somente EAC de CcB.

3.5 Marcação e Pesagem

No início do estudo, os animais foram marcados no lóbulo da orelha e pesados individualmente. Foi registrado o peso corporal inicial (momento da indução do DM), bem como no momento da morte dos animais. Foi utilizada uma balança da marca Sartoris[®], com peso em gramas para a pesagem dos animais.

3.6 Indução do Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (STZ) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) na dose de 70 mg/Kg de peso corporal^[142].

A estreptozotocina foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,1M, pH 4,5) e ácido cítrico (0,1M, pH 4,5) e administrada na região abdominal esquerda do animal, cerca de 10 minutos após a diluição em solução tampão.

Os animais do grupo controle receberam somente NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume utilizado para dissolver a STZ. O período do estudo foi de sessenta dias, a contar do dia em que os animais diabéticos apresentaram uma glicemia sanguínea acima de 250mg/dL, sendo considerado diabéticos.

3.7 Preparação do Extrato Aquoso da Casca do caule de *Croton cajucara* BENTH

A casca do caule de *Croton cajucara* BENTH utilizada no estudo é procedente da cidade de Santarén no Estado do Pará - Brasil.

Para a preparação do extrato aquoso (EA) foi necessário triturar a casca do *Croton cajucara* BENTH até virar pó. O chá foi preparado com 5g da casca triturada do caule do CcB em 100mL de água destilada, fervida durante 10 minutos. Foi dado para cada animal do grupo estudado, 1,5mL do chá intragastricamente (gavagem). Os animais do grupo CO e DM receberam água destilada no mesmo volume com o objetivo de também serem estressados com o procedimento de gavagem.

O chá foi administrado, nos 20 dias e nos 05 dias finais do estudo, aos grupos CO20d, DM20d e CO5d, DM5d, respectivamente. No 60º dia os animais foram mortos e retirando-se os fígados para posteriores análises.

3.8 Avaliação do Potencial Antioxidante *in vitro* do *Croton cajucara* BENTH pelo sistema enzimático Xantina Oxidase por HPLC

Durante o processo de hidroxilação da Hipoxantina, que é transformada em xantina e depois em ácido úrico, a enzima Xantina Oxidase produz também o íon superóxido a partir do oxigênio e, peróxido de hidrogênio, a partir de água. Na presença de Fe (III) e de EDTA, o íon superóxido reduz o Fe (III) para formar Fe (II), que gera, numa segunda etapa, o peróxido de hidrogênio para formar os radicais hidroxila, que são muito reativos (FIGURA 12).

A metodologia para determinar a concentração destes radicais hidroxila no teste é baseada na reação dos radicais hidroxila com o ácido salicílico. Desta maneira, são formados dois compostos estáveis: 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-DHBA) (FIGURAS 12 e 13), mensuráveis via HPLC^[119, 143].

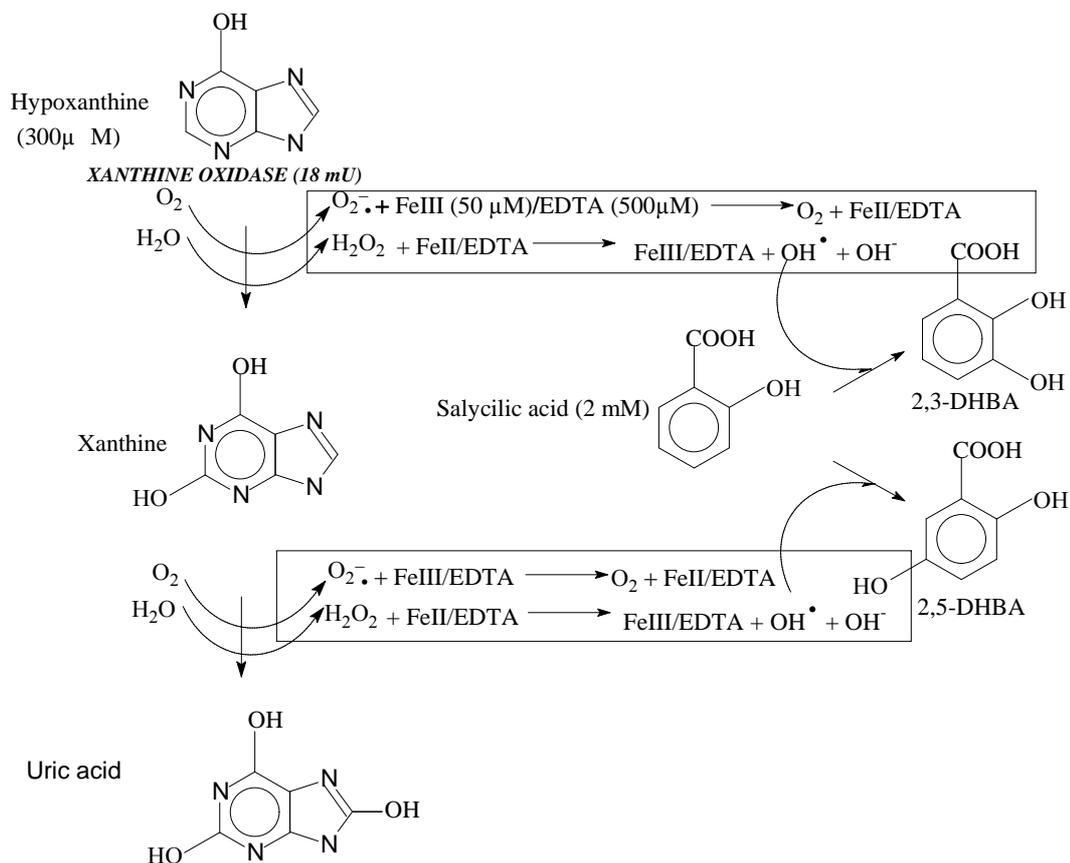


Figura 12. Esquema do ensaio para medir atividades antioxidantes utilizando o sistema da Hipoxantina/Xantina Oxidase (Owen et al., 1996)^[143].

A HPLC é uma técnica que atualmente emprega um conjunto de equipamentos especiais. Eles podem diferir em características e grau de automação, porém, são absolutamente necessários para uma execução conveniente. O reservatório, recipiente que contém a fase móvel, pode estar integrado ao equipamento ou estar externamente porém, deve sempre ser colocado alguns centímetros sobre o nível da bomba. Pode-se usar como reservatório da fase móvel qualquer frasco de laboratório de boa qualidade, preferencialmente deve ser de teflon ou outro polímero conveniente, e com uma tampa adequada para prevenir o ataque de partículas ambientais do sistema e da evaporação da fase móvel^[121].

Segundo Pompeiro^[123], as bombas utilizadas em HPLC têm características totalmente especiais. As principais são de operar a pressões de até 500 atm com a mesma precisão e exatidão de operações à pressão quase ambiente. As bombas não devem ser corroídas pelas fases móveis empregadas.

A injeção da amostra é feita com o auxílio de uma válvula especial que permite a introdução, com grande precisão e exatidão, de quantidades mínimas da ordem de 20 microlitros (μL) ou mais. Esta válvula permite introduzir a amostra na coluna cromatográfica sem interromper o fluxo de solvente através do sistema. Ele deve ser de fácil operação, inerte ao ataque químico e capaz de suportar altas pressões. A amostra a ser analisada é geralmente dissolvida na fase móvel, sendo essa solução aplicada no fluxo da fase móvel à sua entrada no início da coluna. Os volumes de soluções de amostra estão compreendidos, em geral, entre 0,5 e 20 μL , contendo uma massa de soluto entre 0,1 e 10 μg ^[144].

A pré-coluna é uma unidade do equipamento de grande importância na cromatografia líquida do tipo HPLC. Ela contém um enchimento com a mesma fase estacionária do que a coluna cromatográfica, e tem a função de “saturador” da fase móvel nesta mesma fase, impedindo assim o seu arrastamento na coluna analítica pela fase móvel pura^[123].

Segundo Ciola^[120], a separação na HPLC é efetuada dentro das colunas cromatográficas que são geralmente construídas em metais e projetadas para trabalhar a pressões de até 500 atm. Suas dimensões dependem do processo escolhido e elas podem ser separadas em colunas analíticas e colunas preparativas. As colunas analíticas são destinadas à separação de pequenas quantidades de materiais, não existindo, na maioria dos casos, o objetivo de isolar, para fins de identificação dos outros, os materiais separados mas, somente a necessidade de detectá-los para fins quantitativos ou qualitativos. Colunas preparativas são de dimensões maiores e estão dirigidas aos processos de preparação e isolamento de compostos para fins de identificação.

A fase móvel, também chamada de solvente tem um papel fundamental, já que pode por si mesma modificar completamente a seletividade das separações na fase móvel e é, por sua vez, o verdadeiro “motor” das separações na fase reversa. Assim se explica que na HPLC é possível obter um número muito grande de diferentes separações, utilizando a mesma coluna cromatográfica, variando somente a composição da fase móvel. Nem todos os solventes são adequados para trabalhar com HPLC; as fases móveis mais utilizadas na cromatografia líquida são misturas de metanol, acetonitrila e água. Um solvente apropriado deve possuir: 1) alto poder

solubilizante das amostras; 2) baixa reatividade; 3) compatibilidade com o detector utilizado; 4) adequado ponto de ebulição; 5) baixa viscosidade; 6) segurança; e 7) alto grau de pureza^[120].

Segundo Quattrocchi *et al.*^[121], o detector é a parte do equipamento cromatográfico que permite ver ou localizar a posição de cada componente de uma amostra na saída da coluna cromatográfica. Ele é o olho do sistema cromatográfico, mede as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra injetada que estão deixando a coluna. Um avanço considerável, aumentando a sensibilidade, foi o desenvolvimento de novos tipos de detectores como os eletroquímicos, os a base de fluorescência, e os fotômetros UV, que medem as variações na absorbância da luz na região de 190 a 350 nm. Com base numa boa sensibilidade, consegue-se detectar com estes detectores, compostos na ordem de nanogramas. O detector UV-VIS é o mais usado em HPLC e possibilita medir variações na absorbância da luz na região de 190 a 700 nm. Pode-se, também, usar com gradientes de solventes e um detector muito pouco sensível a mudanças de fluxo e de temperatura, com a única limitação de que estes sejam transparentes no comprimento de onda de trabalho.

O resultado de um ensaio cromatográfico é, por um lado, a obtenção de frações separadas dos componentes da amostra, e por outro lado, a de um gráfico chamado cromatograma, de cuja interpretação podem extrair-se conclusões qualitativas e quantitativas. Este registro e a eventual manipulação se obtêm a partir do sinal proveniente do detector por meio de um sistema de aquisição e processamento de dados, entre os quais pode-se citar: 1) o registrador gráfico, que converte o sinal em um gráfico do tipo X-Y; 2) o integrador, permite obter o registro gráfico, chamado de cromatograma e também o tratamento matemático para o cálculo de concentrações; e 3) um programa de computação muito específico, que substituiu a ação do integrador. Este software apropriado permite, tanto o registro gráfico do cromatograma como os cálculos, a manipulação de dados, o armazenamento de ensaios, a geração de dados, bem como o manejo global de vários cromatógrafos. Como os computadores possuem sinais digitalizados, faz-se necessário uma interface analógica-digital que converta o sinal analógico integrado pelo detector^[121].

Utilizou-se uma coluna de fase reversa μ Bondapack C18 (300x3,9 mm – 4 μ m) da empresa Waters e um equipamento de HPLC Alliance (Waters), constituído pelo módulo de separação 2695 (Waters) com autosampler e um detector UV-VIS 2487 dual λ (Waters). A detecção do 2,3-DHBA e do 2,5-DHBA foi feita em 325 nm, com Fase Móvel de gradiente à base dos solventes água/ácido acético (96:4) e metanol, com fluxo de 1 ml/min durante 30 minutos. Em paralelo foi medido num comprimento de onda de 278 nm para monitorar e analisar a quantidade de ácido úrico, o que mostra o funcionamento da enzima.

O ensaio foi feito através da incubação de Hipoxantina, da enzima Xantina Oxidase, na presença de Fe(III), EDTA e de ácido salicílico, e um banho-maria de 37°C durante 3 horas, na presença do extrato de CcB. Depois, 30 μ L de cada amostra foi analisada via HPLC. Foram analisadas concentrações de 1%, 2%, 4%, 5% e 10% e nos volumes de 25, 50, 100, 250 e 400 μ L de EAC de CcB.

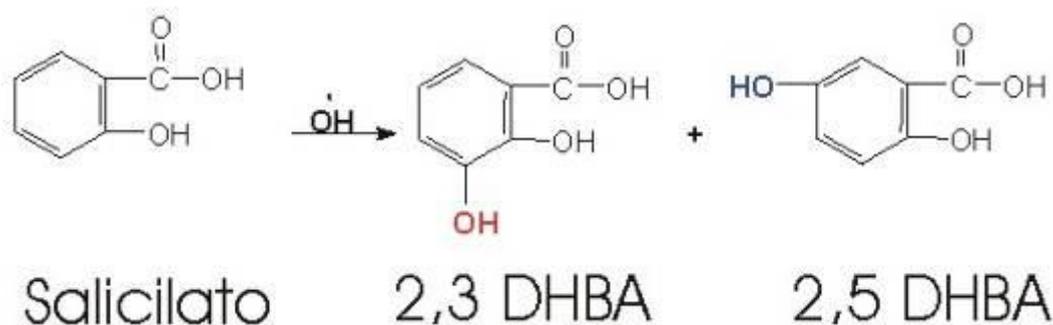


Figura 13. Reação do ácido salicílico com os radicais hidroxila formando 2,3- e 2,5-DHBA (Owen et al., 1996^[143]).

3.9 Avaliação do Potencial Antioxidante *in vivo* do *Croton cajucara* BENTH através da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*

3.9.1 Meios de cultura e soluções

O crescimento das células foi feito em meio líquido completo (YEL), contendo 0,5% de extrato de levedura, 2% de bactopectona e 2% de glicose. Para determinação do número de células viáveis, ou seja unidades formadoras de colônias, foram realizadas sementeiras em meio YEPD solidificado com 2% de bacto-ágar. Para ressuspensão das células e diluições para posterior sementeira, utilizou-se solução salina (solução de NaCl 0,9%).

3.9.2 Detecção da atividade antioxidante *in vivo* em *Saccharomyces cerevisiae*

Para a análise da atividade antioxidante, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficiente e deficiente no sistema da defesa antioxidante (SOD, *sod1Δ*, *sod2Δ*, *sod1Δsod2Δ*) foram utilizadas no ensaio de sobrevivência. As células, em fase estacionária de crescimento, foram submetidas a centrifugação e lavadas duas vezes com solução salina. A densidade das células foi determinada usando uma câmara de contagem de Neubauer. Os extratos foram preparados em uma concentração de 2mg/mL em DMSO. Uma suspensão, contendo 2×10^7 céls/mL, foi inoculada em solução salina juntamente com doses crescentes do extrato (50 - 500 μ L) e H₂O₂ 4mM por 1 hora em estufa à 30°C, sendo posteriormente sementeiras em placas de meio YEPD. Logo após, as placas foram acondicionadas em estufa à 30°C por 48 ou 72 horas. Após este tempo, foi feita contagem das colônias, sendo os resultados tabelados e submetidos a tratamento estatístico. O ensaio foi repetido por 3 vezes.

3.10 Morte dos Animais

Após o período de sessenta dias, os animais foram anestesiados com cloridrato de Cetamina (Ketalar[®]) e cloridrato de Xilasina (2,6-xilidina) – 5,6 dihidro-4h-1,3 tiazina (Rompum[®]), numa proporção de 100mg/kg de Cetamina para 50mg/kg de Xilasina. Os anestésicos foram administrados intraperitonealmente na região abdominal esquerda.

A profundidade da anestesia foi controlada pelos reflexos plantares e oculopalpebrais quando se realizava algum tipo de pressão nas patas dos animais.

Primeiramente o sangue foi retirado do animal através do plexo retro-orbital^[145] e colocado num tubo de ensaio com heparina (Liquemine[®]), para evitar a coagulação. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e permaneceram sob ventilação espontânea, respirando ar ambiente.

Posteriormente, realizou-se tricotomia e desinfecção da região abdominal, seguida da intervenção cirúrgica, que iniciou com uma laparotomia ventral média onde foi retirado o fígado e, em seguida congelado em nitrogênio líquido, para posteriores análises estabelecidas. Os animais anestesiados foram mortos por pneumotórax.

3.11 Obtenção do Plasma e Determinação da Glicemia, Colesterol e Triglicerídeos

O sangue foi retirado do animal através do plexo retro-orbital e colocado num tubo de ensaio com heparina (Liquemine[®]), para evitar a coagulação. Após se realizou a centrifugação do material a 4.000 rpm pelo tempo de 10 minutos.

O precipitado foi desprezado e o plasma retirado com pipeta (*Labsystems* 4500, 200-100 µL) para ser congelado em freezer à temperatura de -70° C para posterior determinação dos índices de glicemia, colesterol e triglicerídeos.

Para determinação da glicemia foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Glicose PAP, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do

plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- *Visible Spectrophotometer Varian*) com comprimento de onda de 500nm. Foram considerados diabéticos para esse estudo os animais que apresentaram a concentração de glicose sanguínea acima de 250 mg/dL^[146].

Para determinação dos níveis de colesterol foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Colesterol Liquiform, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- *Visible Spectrophotometer Varian*) com comprimento de onda de 500nm. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pelas colesterol esterases à colesterol livres e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela colesterol oxidase à colest-4-en-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-amino-antipirilquironimina terá absorvidade máxima em 500nm^[147].

Para determinação dos níveis de triglicerídeos foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit Triglicerídeos Liquiform, LAB TEST), no qual o reagente foi misturado a 40 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- *Visible Spectrophotometer Varian*) com comprimento de onda de 410nm. Os triglicerídeos são hidrolisados enzimaticamente por uma lipase específica, produzindo glicerol e ácido graxo. O glicerol se oxida com ácido perclórico à formoladeído, que é quantificado colorimetricamente a 410 nm como 3,5-diacetil-1,4-diideolutidina^[148].

3.12 Atividade das Aminotransferases (AST, ALT e FA) – Provas de Integridade Hepática

Para a determinação da AST (aspartato-aminotransferase) e da ALT (alanina-aminotransferase) no plasma foi utilizado o método enzimático comercial (Boehringer Mannheim, Alemanha). Assim, a atividade enzimática do AST e ALT foi obtida através da medição cinética a 567 nm.

A AST catalisa a reação do α -cetogluturato e do ácido alanina sulfínico a piruvato e glutamato. A ALT catalisa a reação do α -cetogluturato e alanina a piruvato e glutamato. O piruvato se hidrolisa a acetilfosfato, após a ação do piruvato oxidase

(POD), anidrase carbônica e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em presença de POD, o H_2O_2 oxida a forma reduzida incolor do indicador à forma azul.

Para determinação da atividade da FA (Fosfatase Alcalina) no plasma foi empregado o método enzimático automatizado. Para isto, utilizou-se como substrato o para-nitrofenilfosfato mais água, que formou para-nitrofenol, composto intensamente amarelo, com um máximo de absorbância de 400nm.

3.13 Preparo do Homogeneizado

Foram utilizados dois tipos de homogeneizados: o primeiro para realizar a quantificação de proteínas e a avaliação da atividade de enzima GPx (Homogeneizado 1) e o segundo para realizar a quantificação de MDA por HPLC (Homogeneizado 2).

Para homogeneizar o fígado (Homogeneizado 1) dos animais foram colocados 9mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM; pH 7,4) por grama de tecido. A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante 40 segundos, à temperatura de 0 a 4°C. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado em uma centrífuga refrigerada (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge) por 10 min a 3000 rpm ($1110 \times g$)^[80]. O precipitado foi desprezado, o sobrenadante retirado e congelado em freezer a uma temperatura de -70 °C para posteriores dosagens.

Para o homogeneizado de fígado utilizado na detecção e quantificação de MDA por HPLC (Homogeneizado 2), foram misturados 0,5g de fígado em 2,5ml (0,25M) TRIZMA BASE BUFFER (pH 7,4), 0,2 M SUCROSE e 5nM DTT (DL-Dithiotreitol). A homogeneização foi realizada em um aparelho Ultra-Turrax (IKA-WERK) durante 40 segundos, à temperatura de 0 a 4°C. Posteriormente, centrifugou-se por 30 min em 4°C em $10.000 \times g$ (SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge); coletou-se o sobrenadante e separando-os em tubos eppendorfs^[149].

3.14 Quantificação das Proteínas

A concentração das proteínas do homogeneizado hepático foi determinada através do método de Lowry e colaboradores^[150]. Esse método utiliza como padrão uma solução de 1 mg/mL de albumina bovina (Sigma[®]), utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 μ L. Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 μ L) em 780 μ L de água destilada e 2,0mL de reativo C. Este último foi preparado somente no momento que seria utilizado e consistiu na mistura de 50mL de NaHCO₃, somado a 0,5mL do reativo B1 (CuSO₄.H₂O 1%) e 0,5mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados 10 minutos, colocando-se a seguir 0,2mL do reativo Folin-Ciocalteu 2N (Laborclin), na concentração de 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, a solução apresentou coloração azulada que pôde ser medida num espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm.

3.15 Determinação do Estresse Oxidativo

3.15.1 Mensuração de Malondialdeído (MDA) por HPLC

Foi avaliada a lipoperoxidação através da quantificação de MDA, um biomarcador de estresse oxidativo, por HPLC descrita por Mateos *et al.*^[149]. Realizou-se a padronização e validação da técnica, seguindo preconização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Resolução RE nº 899-29/05/2003). Concentrações pré-estabelecidas de MDA (0,033; 0,1; 0,33; 1,0; 3,33 e 10 μ g/mL) foram medidas 3 vezes cada amostra por 3 dias consecutivos, sendo seus resultados avaliados estatisticamente e sendo considerados padronizados se não houver diferença significativa estatisticamente.

A técnica adaptada de Mateus *et al.*^[149], padronizada e validada consiste em coletar 250 μ L de amostra (Homog. 2) e adicionar 50 μ L NaOH (Hidróxido de Sódio) (6M). Incuba-se por 30 min a 60°C em banho-maria, para ocorrer a liberação do MDA ligado a proteínas. Num segundo momento, realiza-se a precipitação de proteínas, adicionando à amostra, 125 μ L de 35% (v/v) de Ácido Perclórico (HClO₄) e centrifugar por 10 min a 2800 x g. Coleta-se 250 μ L do sobrenadante e adiciona-se 25 μ L de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina), preparado com 5mM de solução em 2M

Ácido Clorídrico (HCl). Incuba-se por 30 min em temperatura ambiente e protegido da luz. Injeta-se, então, 50µL da amostra incubada, em HPLC Alliance (Waters), constituído por uma bomba 2695 (Waters) com autosampler e um detector UV-VIS 2487 dual λ (Waters).

Para este procedimento, utilizou-se uma coluna de fase reversa μ Bondapack C18 (300x3,9 mm – 4 μ m, Waters) e a análise foi feita utilizando uma Fase Móvel Isocrática a base de 0,2% (v/v) ácido acético, água deionizada e acetonitrila 8:38 (v/v), com fluxo de 0,6mL/min durante 21 minutos e com detecção num comprimento de onda de 310 nm. As concentrações de MDA foram expressas em nmol de MDA/mg de proteína.

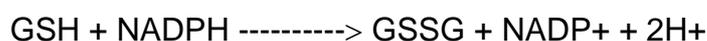
3.15.2 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A determinação da glutathione peroxidase selênio dependente, mediante o método de Guntzler e Flohé^[151], consiste em medir a velocidade de consumo do NADPH em um sistema que contenha GSH, sendo que a oxidação se registra espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm. Então:

GPx



A atividade da GPx pode ser estudada, medindo a velocidade de consumo de NADPH num sistema que contenha GSH.



Essa técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo a velocidade de oxidação do NADPH em uma reação.

Para tal, em uma cubeta de quartzo foram colocados 2,7mL de solução reguladora de fosfatos de Na⁺ e K⁺ (100 mM, pH 7,0) com 50 µL de NADPH (10mM), 150 µL de BOOH (10mM) e 50 µL de glutathione redutase (12 U/mL). A mistura foi lida durante 1 minuto, quando se fez uma linha de base e em seguida foram adicionados 50 µL de GSH (100mM) e 50 µL do homogeneizado. As amostras foram incubadas a 25°C durante 5 minutos, e lidas numa absorvância de 340 nm. A atividade foi expressa em µmol/min.g de tecido.

3.16 Análise Estatística

Após a determinação de todos os parâmetros experimentais, os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DP) para cada grupo experimental.

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico Statistical Package for Sciences, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Os dados de peso corporal, níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos foram testados pela Análise de Variância para Medidas Repetidas e aplicado o Teste "t" de Student para as amostras pareadas.

Para os dados das leveduras, enzimas hepáticas, níveis de MDA e GPx utilizou-se a análise de variância simples (ANOVA), a fim de comparar as diferenças observadas em cada parâmetro estudado. Foi aplicado também o teste complementar de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.

A análise do potencial antioxidante foi avaliada através de Regressão Linear Múltipla, definindo-se o coeficiente de correlação de Pearson.

Considera-se para afirmar no texto que existe diferença estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas, a utilização do nível mínimo de significância de cada uma delas de, em pelo menos, 5% (p<0,05).

RESULTADOS



4 RESULTADOS

Os resultados apresentados neste estudo, com base nos objetivos propostos, são referentes a todos os grupos avaliados e têm a seguinte ordem:

- 1-Potencial Antioxidante *in vitro* do EAC de CcB por HPLC.
- 2-Potencial Antioxidante *in vivo* do EAC de CcB em leveduras.
- 3-Peso corporal.
- 4-Níveis sanguíneos de glicose, colesterol e triglicerídeos.
- 5-Provas de função hepática AST, ALT e FA.
- 6-Marcador de estresse oxidativo MDA por HPLC.
- 7-Atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase (GPx).

4.1 Potencial Antioxidante *in vitro* do *Croton cajucara* BENTH pelo sistema enzimático Xantina Oxidase por HPLC

Através das análises cromatográficas (FIGURA 14) pode-se observar a detecção por HPLC dos compostos estáveis 2,3 e 2,5-DHBA e determinar o potencial antioxidante do EAC do *Croton cajucara* BENTH. Na FIGURA 14A, observa-se o cromatograma padrão da amostra sem enzima e sem o EAC, sendo utilizado para comprovar a ausência de picos (relativos às moléculas detectadas) na região de interesse, que interfeririam nas análises dos picos de interesse. Da mesma forma, pode-se visualizar na FIGURA 14B a ausência de picos na região de interesse no cromatograma da amostra de EAC sem a enzima Xantina Oxidase.

Na análise cromatográfica onde se empregou somente o sistema enzimático, pode-se observar dois picos independentes (FIGURA 14C), em tempos de retenção diferentes, que foram respectivamente, os compostos 2,5-DHBA (tempo de retenção: 11,422 min) e 2,3-DHBA (tempo de retenção: 13,390 min). Para afirmar que os picos apresentados são relativos aos compostos DHBA foram realizadas cromatografias prévias, utilizando-se os compostos 2,3- e 2,5-DHBA padrão (substância pura - Merck®) e definindo de antemão seus tempos de retenção, que foram praticamente invariáveis, tendo apenas variação de área de gráfico devido à ação das substâncias antioxidantes.

Na FIGURA 14D, observa-se a ação do EAC de Sacaca numa concentração de 10% sobre a formação dos compostos estáveis 2,3- e 2,5-DHBA, reduzindo as áreas de seus picos em 50% e demonstrando o potencial antioxidante do *Croton cajucara* BENTH.

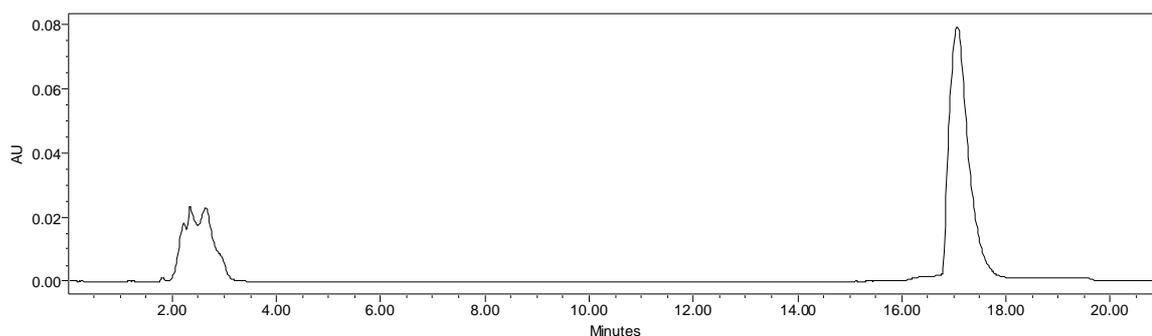


Figura 14A. Cromatograma do mix sem enzima, sem EAC de CcB (325 nm)

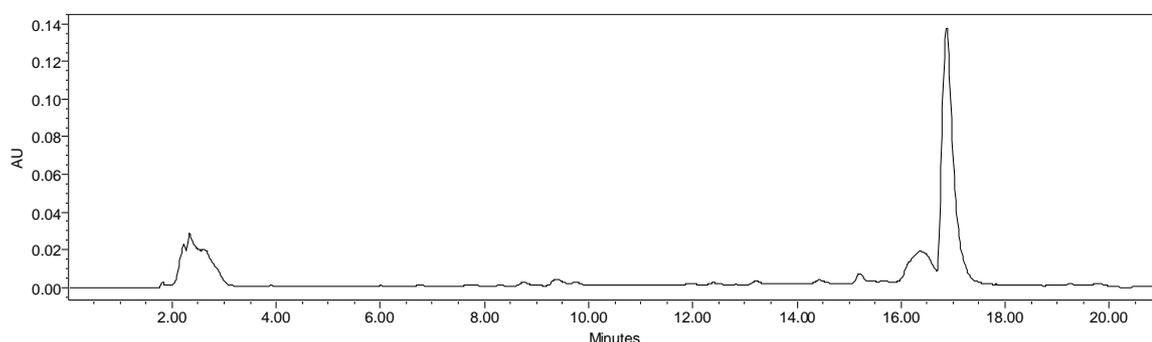


Figura 14B. Cromatograma do mix sem enzima e com EAC de CcB (10%) (325 nm)

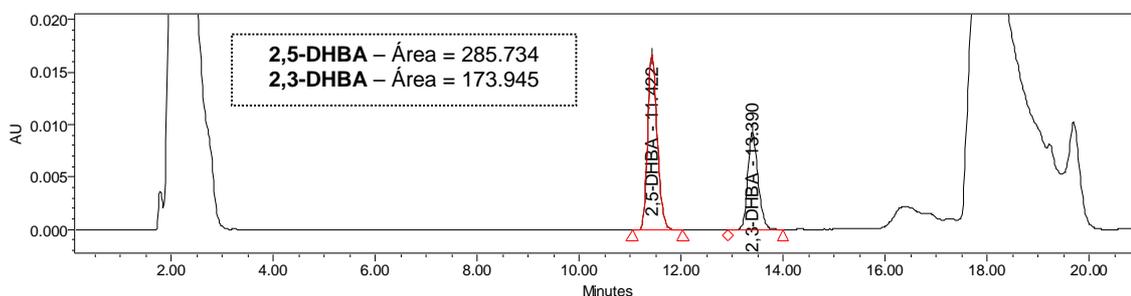


Figura 14C. Cromatograma do mix com enzima (sem EAC de CcB) (325 nm)

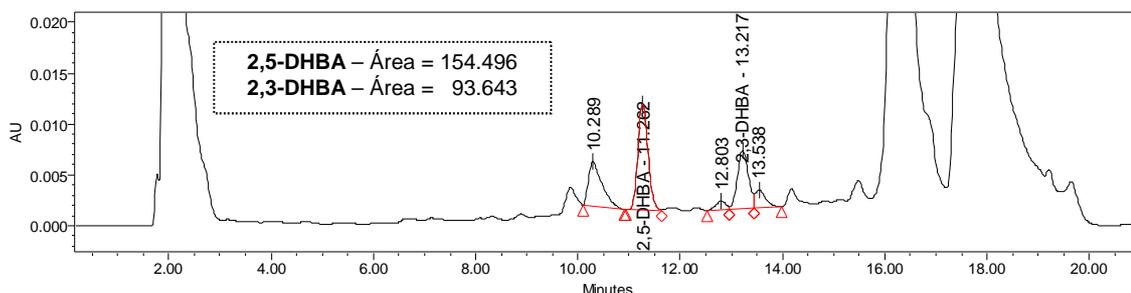


Figura 14D. Cromatograma do mix com enzima e 100 µL de EAC de CcB (10%) (325 nm)

Figura 14. Cromatogramas do potencial antioxidante in vitro do CcB.

Analisando todos os resultados das áreas dos picos obtidos a partir dos cromatogramas dos ensaios enzimáticos da Xantina Oxidase, com EAC de Sacaca nas concentrações de 1%, 2%, 4%, 5% e 10% e nos volumes de 25, 50, 100, 250 e 400 µL, pode-se verificar que o *Croton cajucara* BENTH apresenta atividade antioxidante (redução da formação ou varredura das EAOs) dependente de volume e concentração, conforme são observados na TABELA 1 e FIGURA 15. Verifica-se que na concentração de 10% e volume de 400µL houve a maior redução na formação de espécies reativas de oxigênio, aproximadamente $74,2\pm 0,86\%$, comprovando assim, sua ação “scavenger” antioxidante.

Tabela 1. Pontencial antioxidante in vitro de várias concentrações e volumes de EAC de CCB.

Concentração de EAC CcB (%)	Dose de EAC CcB ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	DHBAs (%)	Redução das EAOs (%)
0	0	100	0
1	50	94,69 \pm 0,87	5,31 \pm 0,87
1	100	71,40 \pm 0,26	28,60 \pm 0,26
1	250	68,70 \pm 1,31	31,30 \pm 1,31
1	400	60,43 \pm 1,59	39,57 \pm 1,59
2	50	82,83 \pm 0,55	17,17 \pm 0,55
2	100	86,33 \pm 1,51	13,67 \pm 1,51
2	250	70,30 \pm 0,34	29,70 \pm 0,34
2	400	50,20 \pm 1,47	49,80 \pm 1,47
4	50	81,43 \pm 0,66	18,57 \pm 0,66
4	100	86,33 \pm 1,51	13,67 \pm 1,51
4	250	70,30 \pm 0,34	29,70 \pm 0,34
4	400	50,20 \pm 1,47	49,80 \pm 1,47
5	50	79,70 \pm 0,34	20,30 \pm 0,34
5	100	63,33 \pm 1,06	36,67 \pm 1,06
5	250	43,43 \pm 0,55	56,57 \pm 0,55
5	400	30,33 \pm 0,05	69,67 \pm 0,05
10	50	69,80 \pm 0,87	30,20 \pm 0,87
10	100	46,83 \pm 0,23	53,17 \pm 0,23
10	250	34,96 \pm 1,27	65,04 \pm 1,27
10	400	25,80 \pm 0,86	74,20 \pm 0,86

Nota: Resultados expressos como média \pm desvio padrão da média.

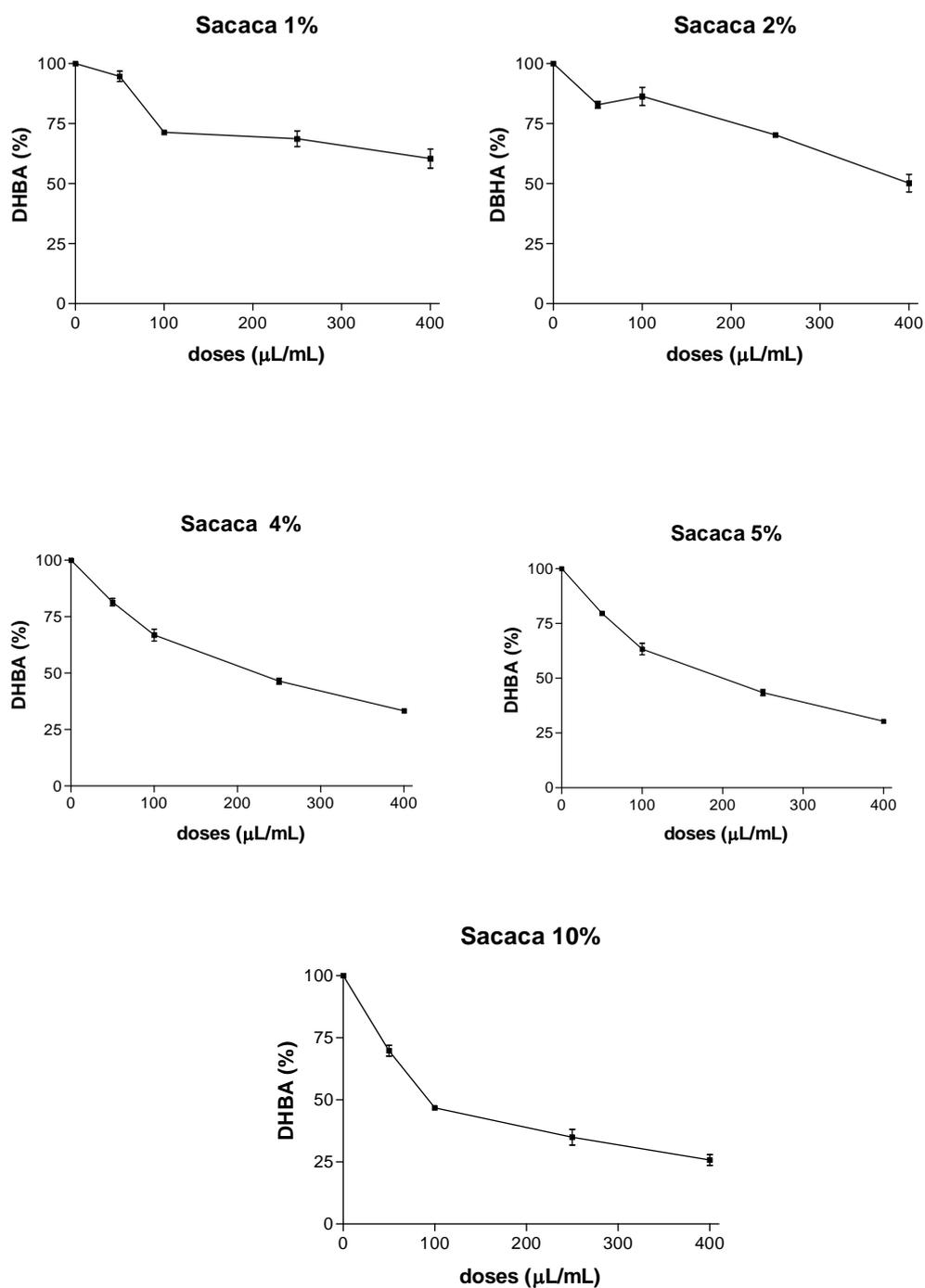


Figura 15. Pontencial antioxidante in vitro de várias concentrações e volumes de EAC de CCB. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

Através da Equação da Regressão Linear Múltipla [DHBA=99,7-3,5*concentração-0,10*dose], observou-se a relação de causa-efeito entre a variável dependente “percentagem de DHBA” e as variáveis independentes “dose” e “concentração” da EAC de CcB. Conforme a Equação derivada dos dados da TABELA 2, verifica-se que a cada uma variação percentual de concentração do EAC de CcB o nível de DHBA varia em -3,5% e que a cada uma variação de $\mu\text{L}/\text{mL}$ de dose o nível de DHBA varia em -0,10%. Segundo o Coeficiente de Determinação (R^2 ajustado) observa-se que as variações de dose e concentração de Sacaca explicam em 86% o nível de DHBA.

Tabela 2. Coeficientes das variáveis de Regressão Linear Múltipla para o desfecho DHBA (%).

Variáveis	B	Ic β	p
Concentração	-3,5	-4,6 a -2,4	<0,001
Dose	-0,10	-0,1 a -0,07	<0,001

Nota: Equação da Regressão [DHBA=99,7-3,5*concentração-0,10*dose].

Pelos dados obtidos através do Coeficiente de Correlação de Pearson constata-se que há relação estatisticamente significativa inversa entre a DHBA (%) x Concentração (%) e DHBA (%) x Dose ($\mu\text{L}/\text{mL}$), conforme apresentado na TABELA 3.

Tabela 3. Correlação de Pearson para percentagem de DHBA, dose e concentração de EAC de CcB.

	DHBA (%)
Concentração (%)	-0,612*
Dose ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	-0,759*

*Correlação é significativa para $p < 0,01$.

A varredura de radicais livres de oxigênio com as diferentes concentrações e volumes de EAC de Sacaca pode ser observada e inter-relacionada nas FIGURAS 16 e 17. Assim:

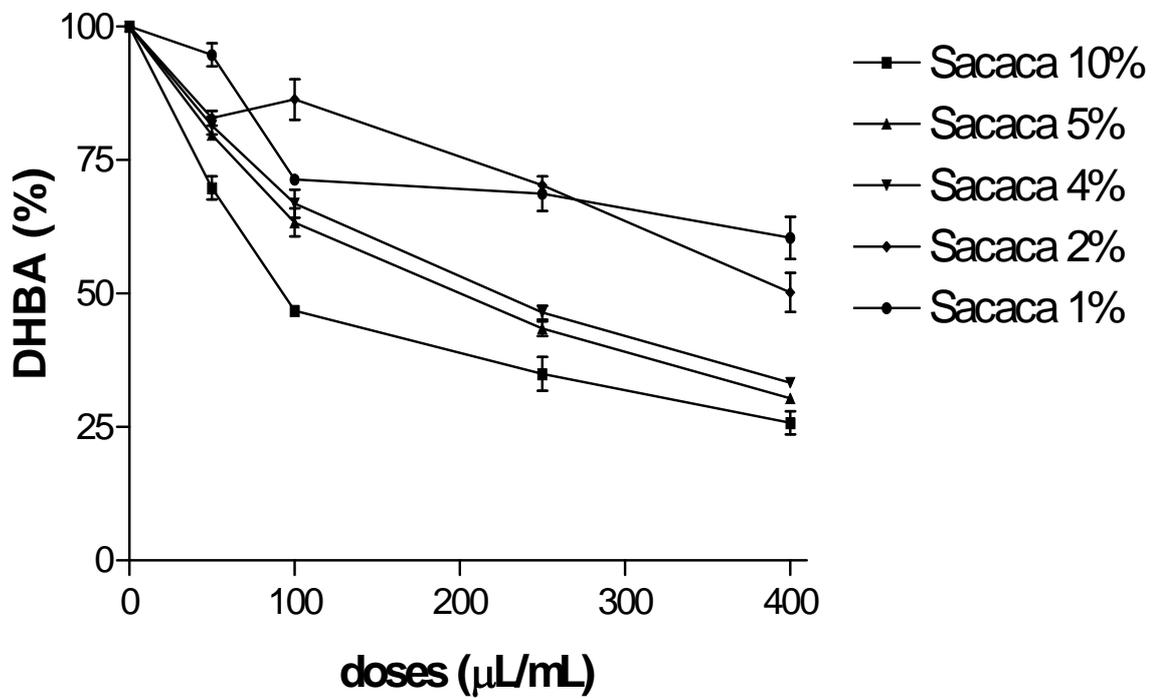


Figura 16. Potencial antioxidante *in vitro* do CcB. Resultados expressos como média \pm desvio padrão.

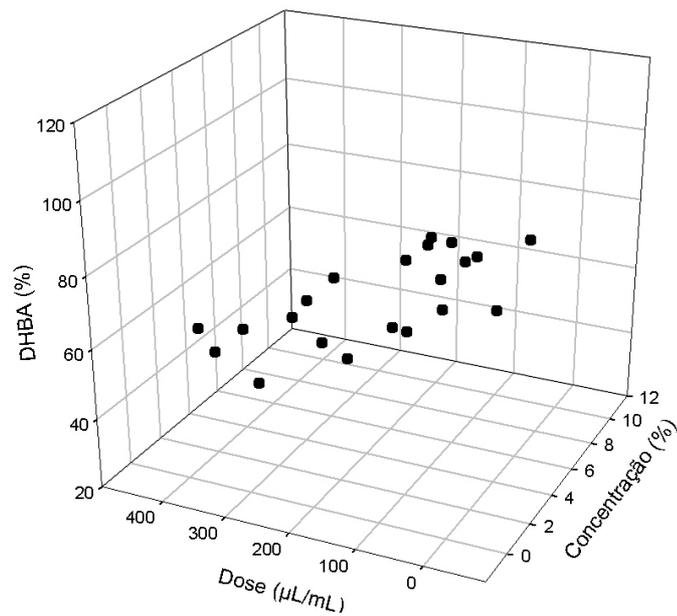


Figura 17. Dispersão dos Dados do Potencial antioxidante *in vitro* do CcB correlacionando as variáveis de DHBA, dose e concentração.

4.2 Atividade Antioxidante *in vivo* do *Croton cajucara* BENTH através da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Na FIGURA 18, estão expressos resultados do ensaio de sobrevivência, utilizando linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* proficientes e deficientes no sistema de defesa antioxidante da enzima superóxido dismutase (*SOD*, *sod1* Δ , *sod2* Δ , *sod1* Δ *sod2* Δ), por meio de um ensaio semi-quantitativo realizado através da inibição de crescimento (teste de sobrevivência), utilizando, também, o EAC de CcB em volumes de 0, 50, 100, 250 e 500 μ l em uma concentração de 5%. Como pode ser observado, existe um aumento no percentual de sobrevivência celular em todas as linhagens, sendo significativo em suas doses mais altas, ao demonstrar um potencial antioxidante do CcB.

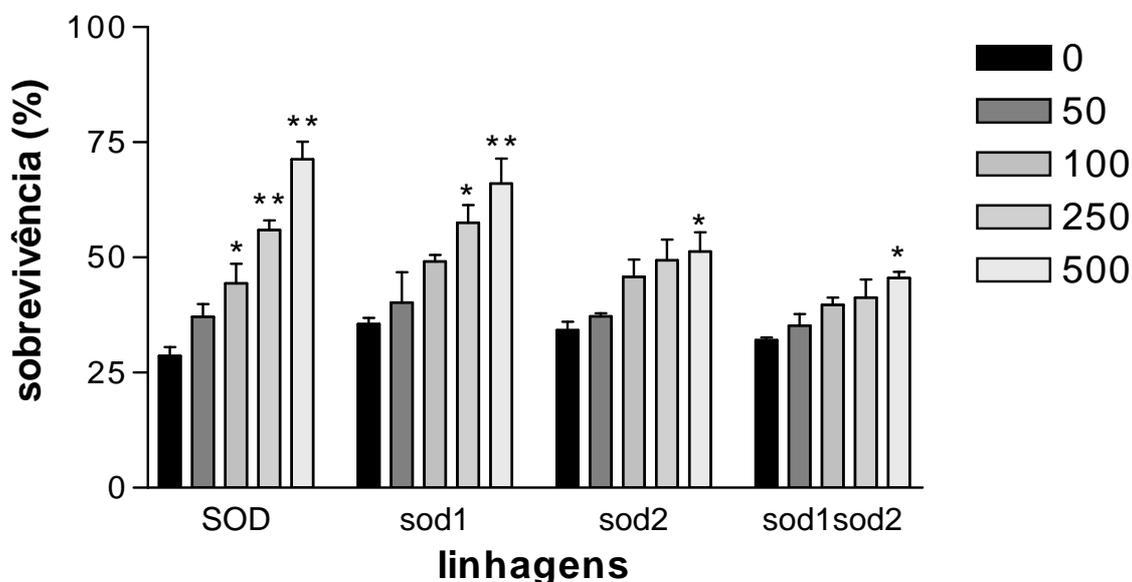


Figura 18. Potencial antioxidante *in vivo* do CcB.

Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os sinais referem-se as seguintes significâncias:

*Dados significativos em relação ao controle positivo (0) com significância de $p < 0,05$;

**Dados significativos em relação ao controle positivo (0) com significância de $p < 0,01$.

4.3 Avaliações Basais

Foram coletados e verificados os dados basais (tempo zero dia – t_0) para as variáveis peso corporal, glicemia, colesterol e triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais. Estes dados são importantes para se observar o comportamento entre os grupos no t_0 e verificar se poderão haver interferências nos dados finais. Através da TABELA 4, percebe-se diferença significativa estatisticamente, para a glicemia, entre os grupos controle e os grupos diabéticos, conforme o esperado, demonstrando que os animais dos grupos DM, DM 5d e DM 20d são realmente diabéticos. O observou-se uma diferença estatística para o peso corporal entre os grupos, porém sem força para ser detectada pelo teste estatístico *post hoc* de Tukey. Esta diferença de pesos corporais basais não tem relevância clínica, pois as diferenças entre as médias dos grupos apresentam pouca variabilidade.

Tabela 4. Médias Basais dos grupos experimentais.

	CO n=10	CO5d n=10	CO20d n=11	DM n=12	DM5d n=10	DM20d n=10	P
Peso (g)	281,00±33,35	262,40±20,13	282,45±25,59	277,75±29,89	254,10±20,01	253,80±27,99	0,034 ^{##}
Glicemia (mg/dL)	177,63±19,80	173,56±25,42	187,26±28,66	468,52±80,50 ^a	392,17±94,40 ^b	440,66±64,50 ^c	<0,001*
Colesterol (mg/dL)	56,98±16,58	53,86±11,77	52,41±14,32	62,97±10,78	58,88±7,47	59,00±13,28	0,572
Triglicerídeos (mg/dL)	58,50±19,92	66,73±20,88	66,99±32,91	73,83±15,89	65,84±13,77	74,32±19,48	0,412

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão.

*Diferença significativa entre os grupos.

[#]Mesmo havendo uma significância estatística com o teste de Análise das Variâncias (ANOVA), não tivemos poder para detectar o grupo diferente com o teste *post hoc* de Tukey.

^aDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^bDiferença significativa entre o grupo DM 5d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^cDiferença significativa entre o grupo DM 20d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

4.4 Peso Corporal

Durante os 60 dias de duração do estudo, efetuando mensurações dos pesos corporais dos animais controles e diabéticos, nos diferentes grupos, antes da indução do Diabetes Mellitus e no dia da morte dos animais, pode-se observar através da Análise de Variância para Medidas Repetidas e pelo Teste “t” *Student* para Amostras Pareadas, como verificadas na TABELA 5, que houve uma alteração global entre o tempo inicial e o final ($P_{tempo} < 0,001$). Foi detectada uma diferença

no comportamento das médias dos grupos entre si ($P_{\text{grupo}} < 0,001$) e uma mudança dos deltas - Δ ($t_{60} - t_0$) dos grupos (Pinteração). Na FIGURA 19, observa-se que as diferenças médias entre o tempo 60 dias (t_{60}) e o tempo zero dia (t_0) foram diferentes de zero estatisticamente nos grupos controle, acusando um aumento de peso corporal nesses grupos.

Tabela 5. Peso Corporal.

	CO (n=10)	CO5d (n=10)	CO20d (n=11)	DM (n=12)	DM5d (n=10)	DM20d (n=10)	Ptempo	Pinteração	Pgrupo
t_0	281,00±33,35	262,40±20,13	282,46±25,59	277,75±29,89	254,10±20,02	253,80±27,99	<0,001	<0,001	<0,001
t_{60}	336,20±56,86	315,40±23,14	349,19±39,14	262,83±26,24 ^a	265,20±45,29 ^b	250,60±45,31 ^c			

Nota: Resultados expressos em gramas como média \pm desvio padrão.

^aDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^bDiferença significativa entre o grupo DM 5d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^cDiferença significativa entre o grupo DM 20d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

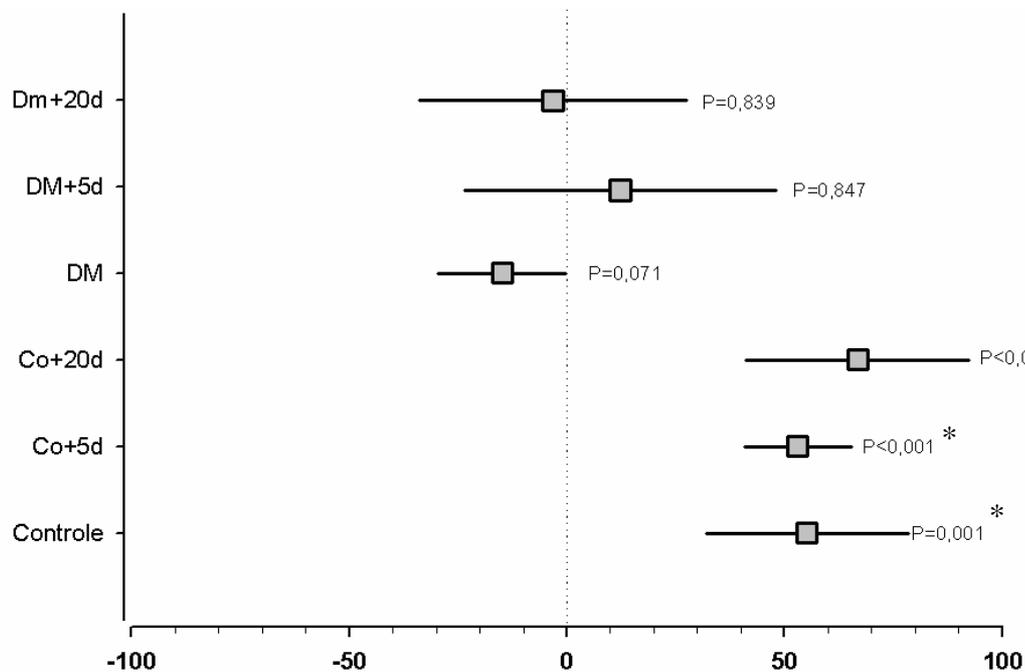


Figura 19. Diferenças médias dos pesos corporais e Intervalo de Confiança 95%.

*Diferentes de zero estatisticamente significante ($p < 0,05$).

4.5 Níveis de Glicemia, Colesterol e Triglicerídeos

Os níveis glicêmicos, colesterolêmicos e de triglicerídeos foram medidos em dois momentos, sendo t_0 e t_{60} . Observando-se os resultados das diferenças das médias entre o t_{60} e t_0 para glicemia na FIGURA 20, verifica-se que não foram diferentes de zero estatisticamente em todos os grupos, excetuando o grupo CO, o qual apresentou uma variação das diferenças das médias dos níveis glicêmicos diferentes de zero estatisticamente. Porém, observa-se na TABELA 6, que as médias dos animais do grupo CO no t_{60} não apresentaram níveis glicêmicos que os identifique como diabéticos.

Tabela 6. Níveis glicêmicos.

	CO (n=10)	CO5d (n=10)	CO20d (n=11)	DM (n=12)	DM5d (n=10)	DM20d (n=10)	Ptempo	Pinteração	Pgrupo
t_0	177,62±19,80	173,57±25,42	187,26±28,67	468,52±80,51	392,17±94,41	440,67±64,51	0,303	0,376	<0,001
t_{60}	215,97±31,17	211,74±48,36	232,09±77,45	444,88±117,5 ^a	372,01±84,72 ^b	440,66±75,41 ^c			

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (mg/dL).

^aDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^bDiferença significativa entre o grupo DM 5d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^cDiferença significativa entre o grupo DM 20d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

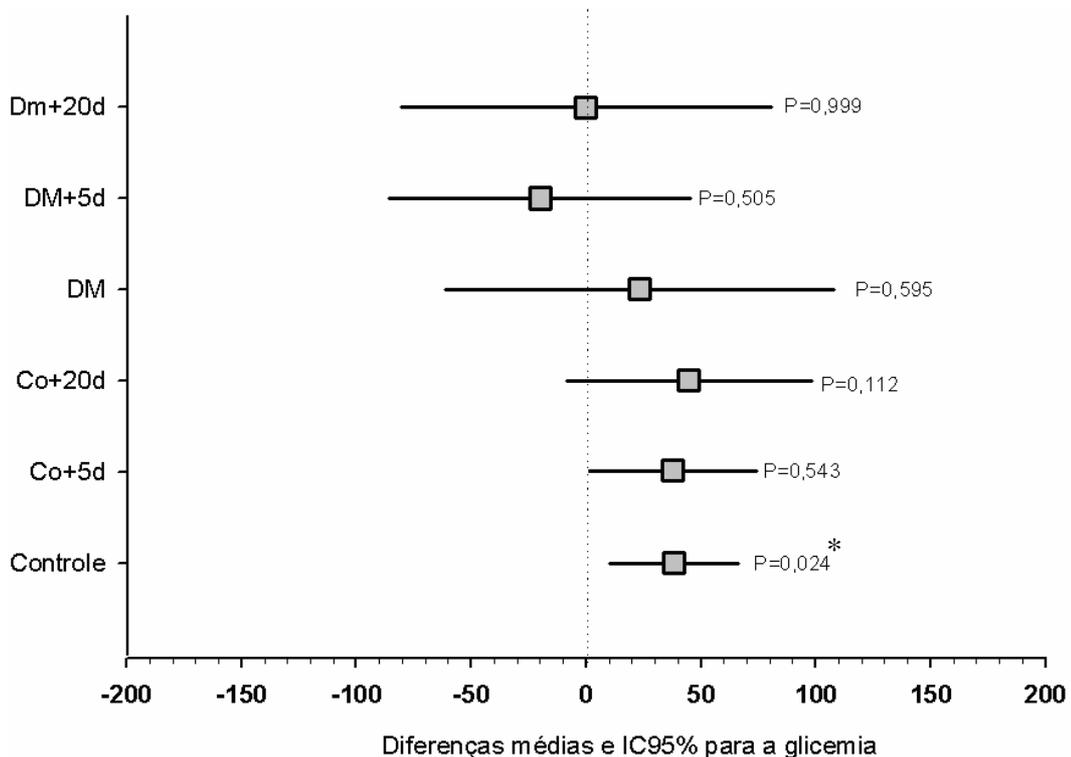


Figura 20. Diferenças médias para os níveis glicêmicos e Intervalo de Confiança 95%.

*Diferente de zero estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Através dos resultados das médias entre o $t60$ e $t0$ para colesterol, conforme a TABELA 7 e, das diferenças das médias na FIGURA 21, verifica-se que os grupos DM e DM5d foram diferentes de zero estatisticamente, comparando-se com os demais grupos e, que os grupos diabéticos aumentaram seus níveis de colesterol no $T60$ ($P_{tempo} < 0,01$).

Tabela 7. Níveis de colesterol.

	CO (n=10)	CO5d (n=10)	CO20d (n=11)	DM (n=12)	DM5d (n=10)	DM20d (n=10)	Ptempo	Pinteração	Pgrupo
$t0$	56,98±16,58	53,87±11,78	52,41±14,32	62,97±10,77	58,88±7,48	59,01±13,28	<0,001	0,012	0,001
$t60$	51,85±17,99	55,49±13,76	58,31±12,73	80,91±16,99 ^a	74,83±9,57 ^b	73,42±18,24 ^c			

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (mg/dL).

^aDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^bDiferença significativa entre o grupo DM 5d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^cDiferença significativa entre o grupo DM 20d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

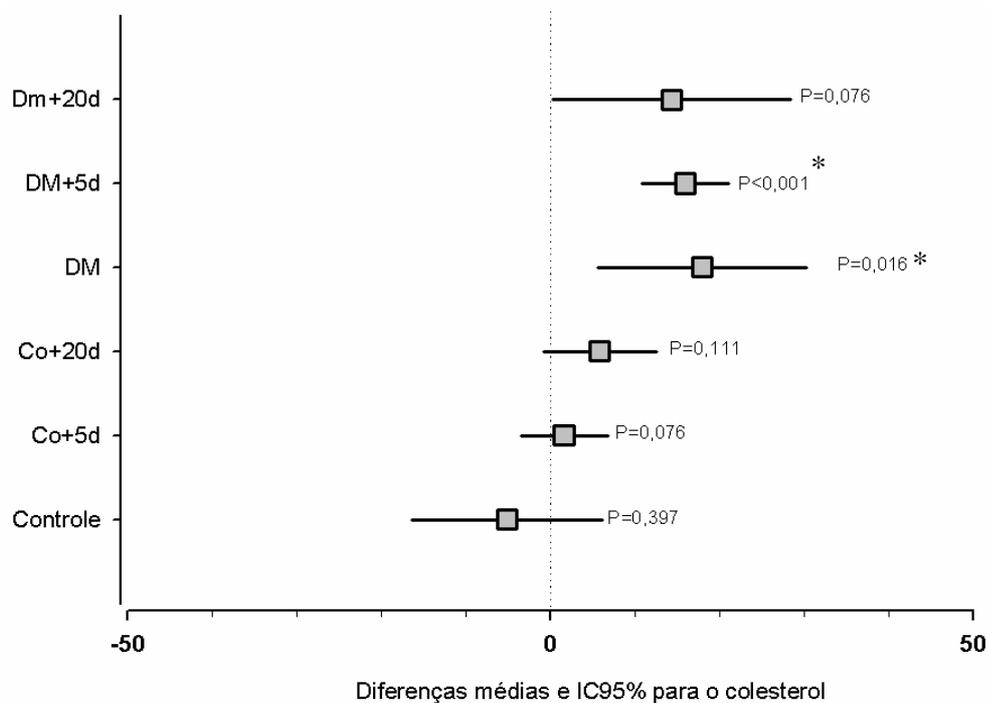


Figura 21. Diferenças médias para os níveis de colesterol e Intervalo de Confiança 95%.

*Diferentes de zero estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Comparando-se os resultados das médias entre o $t60$ e $t0$ para triglicerídeos na TABELA 8 e as diferenças das médias da FIGURA 22, observa-se que o grupo DM foi diferente de zero estatisticamente. Os grupos DM5d e DM20d apresentaram níveis de triglicerídeos semelhantes aos grupos controles (pgrupo=0,017).

Tabela 8. Níveis de triglicerídeos.

	CO (n=10)	CO5d (n=10)	CO20d (n=11)	DM (n=12)	DM5d (n=10)	DM20d (n=10)	Ptempo	Pinteração	Pgrupo
$t0$	58,51±19,92	66,73±20,88	66,99±32,92	73,83±15,90	65,84±13,78	74,32±19,48	<0,001	0,050	0,017
$t60$	91,58±39,24	87,90±24,03	89,66±38,35	195,80±171,69 ^a	84,86±25,92	97,49±85,85			

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (mg/dL).

^aDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d, CO 20d, DM 5d e DM20d.

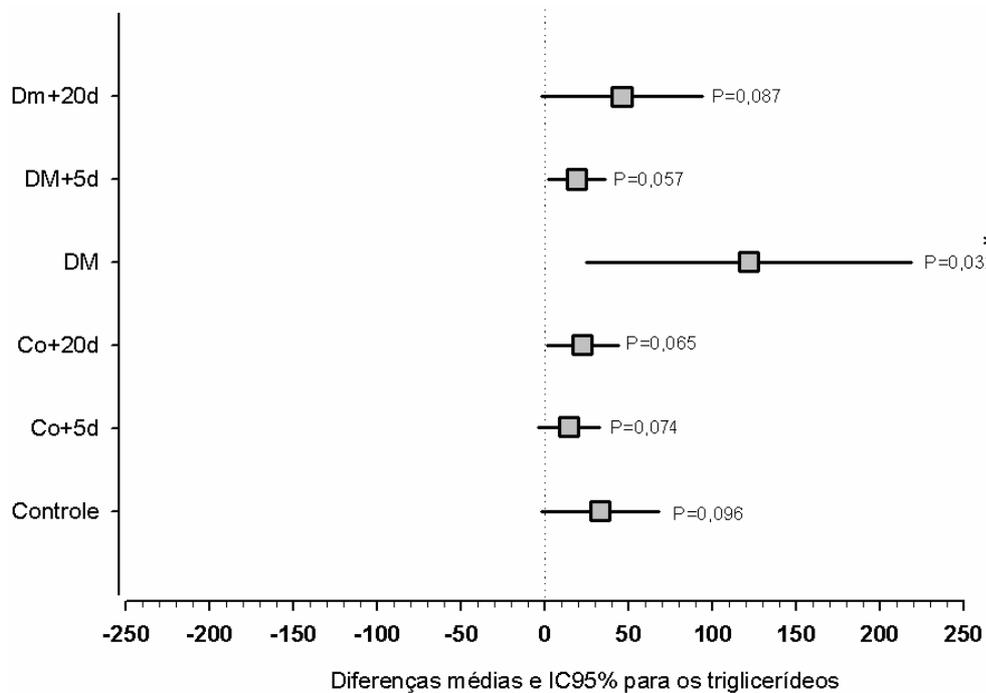


Figura 22. Diferenças médias para os níveis de triglicerídeos e Intervalo de Confiança 95%.

*Diferente de zero estatisticamente significativa (p<0,05).

4.6 Provas de Função Hepática através da atividade das transaminases AST (aspartato-aminotransferase), ALT (alanina-aminotransferase) e da FA (Fosfatase Alcalina)

A atividade das transaminases hepáticas foi mensurada no dia da morte dos animais (*t60*). Conforme os resultados obtidos através da Análise da Variância seguida de Tukey e na TABELA 9, constatou-se diferença significativamente estatística entre os grupos para as enzimas ALT e FA. Não há diferença significativa para a enzima AST entre os grupos.

Tabela 9. Atividade das Aminotransferases Hepáticas.

	CO n=10	CO5d n=10	CO20d n=11	DM n=12	DM5d n=10	DM20d n=10	p
AST	154,90±37,82	149,40±35,72	131,72±39,84	200,83±131,69	127,30±49,13	143,30±69,41	0,190
ALT	53,20±5,88	66,50±33,62	59,46±16,70	122,92±77,32 ^a	71,30±27,11	99,80±34,22	0,001*
FA	136,10±31,81	170,20±57,36	137,46±31,51	423,75±135,10 ^b	248,50±112,39 ^{c,e}	391,20±113,35,99 ^d	<0,001**

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (u/L).

*Diferença significativa entre os grupos com $p < 0,005$.

** Diferença significativa entre os grupos com $p < 0,001$.

^aDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d, CO 20d e DM 5d.

^bDiferença significativa entre o grupo DM comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^cDiferença significativa entre o grupo DM 5d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^dDiferença significativa entre o grupo DM 20d comparado aos grupos CO, CO 5d e CO 20d.

^eDiferença significativa entre o grupo DM 5d comparado aos grupos DM e DM 20d.

Constata-se através dos resultados na FIGURA 23, que não houve diferença estatisticamente significativa detectável entre os grupos para a enzima AST, o que confirma os dados anteriores.

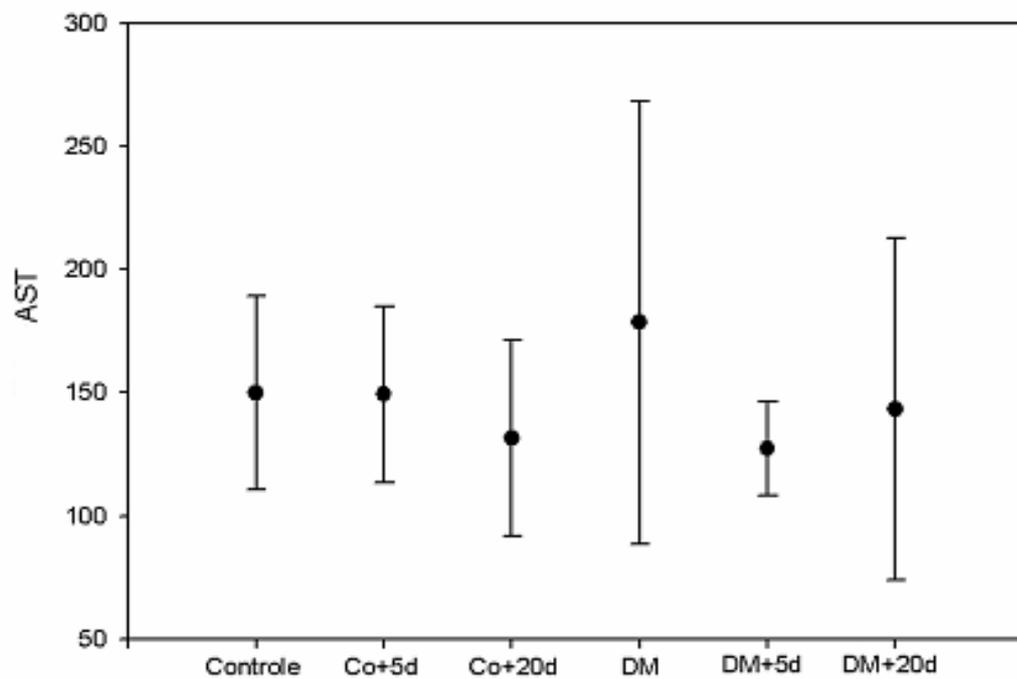


Figura 23. Médias e desvios padrão das médias para os níveis de aspartato-aminotransferase.

Já na FIGURA 24, constata-se através dos resultados obtidos, que houve diferença significativa estatisticamente ($p < 0,005$) entre o grupo DM e os grupos CO, CO5d e CO20d para a enzima ALT. Os animais diabéticos tratados por 5 e 20 dias demonstraram uma tendência de redução dos níveis de ALT comparados ao grupo DM, porém este dado não apresentou significância estatística.

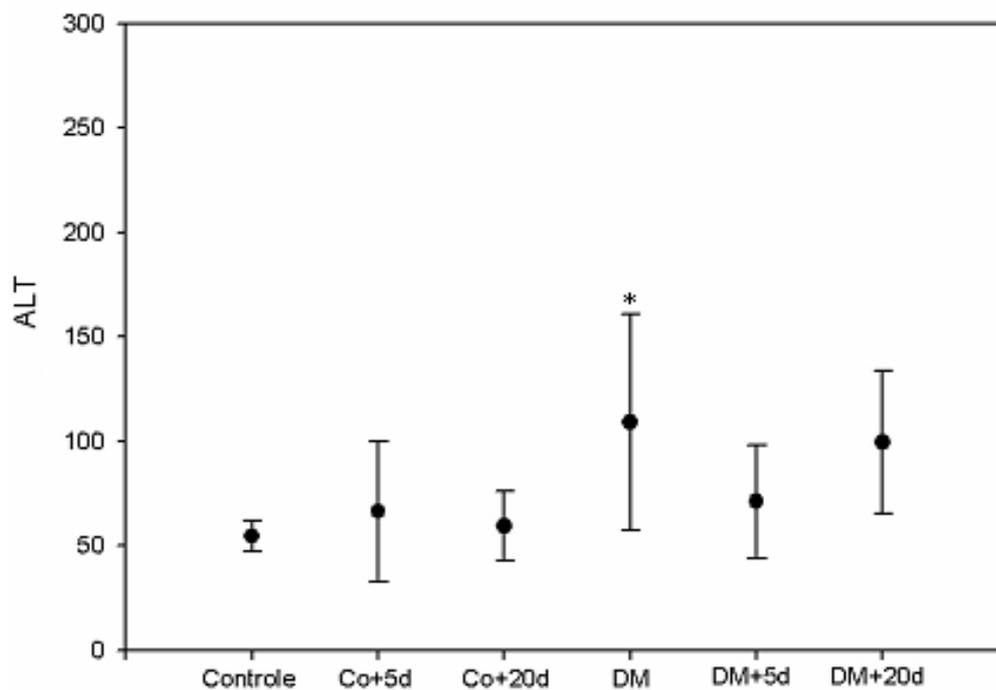


Figura 24. Diferenças médias e desvios padrão das médias para os níveis de alanina-aminotransferase.

* Diferença significativa entre o grupo DM e os grupos CO, CO5d e CO20d ($p < 0,005$).

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos DM e DM20d para os grupos controles, e entre DM5d e os grupos DM e DM20d para a FA, conforme pode-se constatar nos resultados da FIGURA 25.

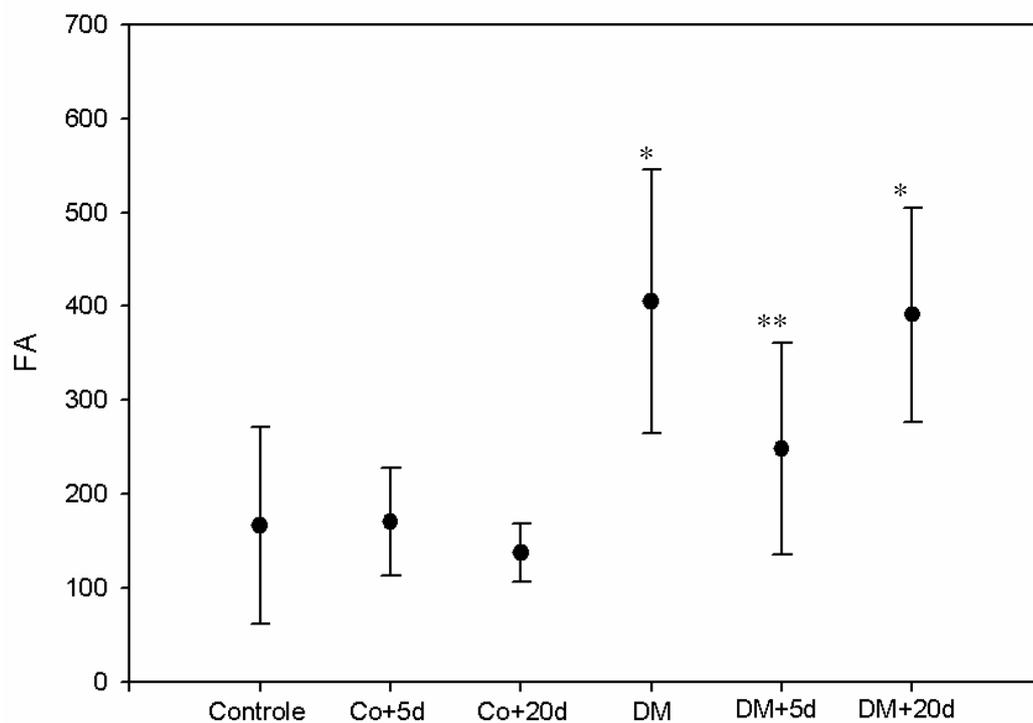


Figura 25. Diferenças médias e desvios padrão das médias para os níveis de Fosfatase Alcalina.

*Diferença significativa dos grupos DM e DM20d para os grupos controles ($p < 0,001$).

**Diferença significativa entre o grupo DM5d e os grupos DM e DM20d ($p < 0,001$).

4.7 Determinação do Estresse Oxidativo

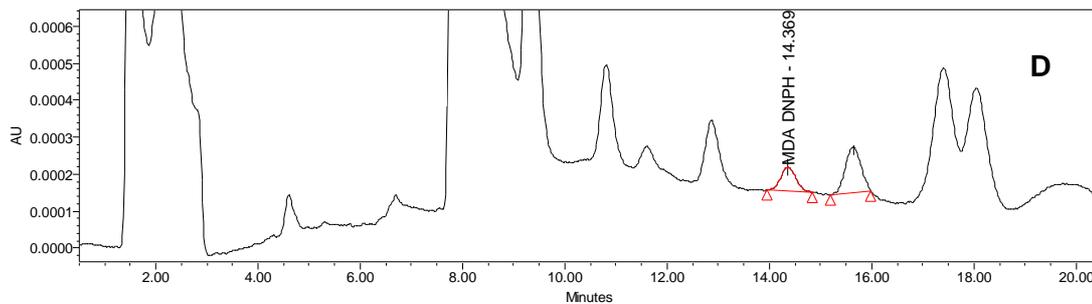
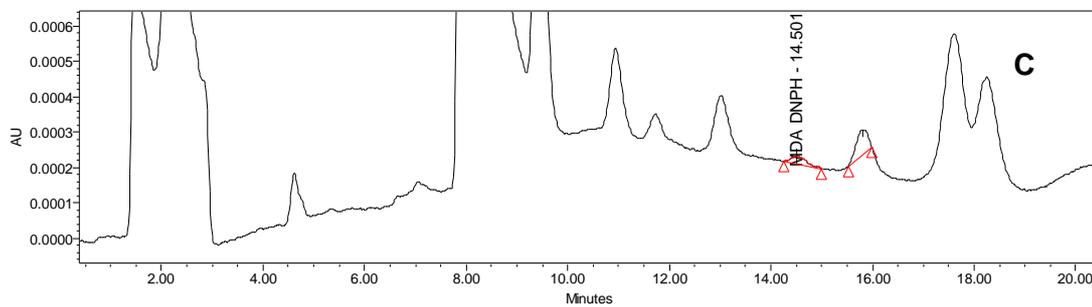
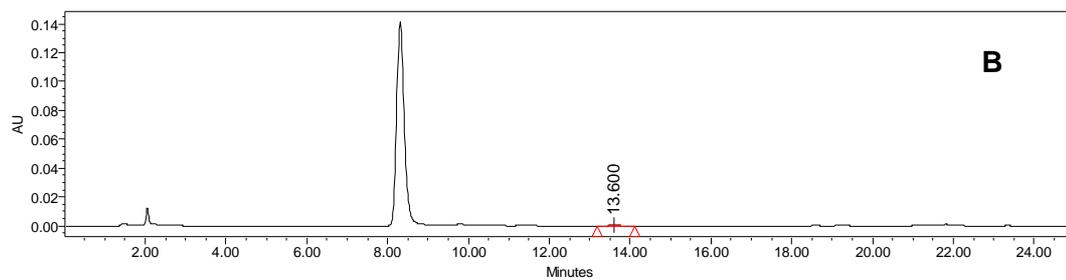
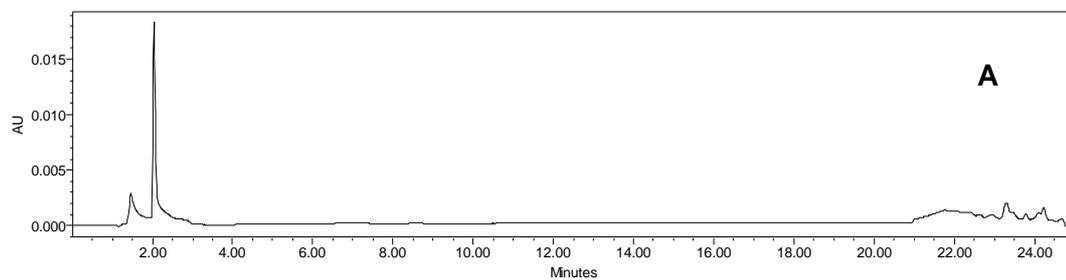
4.7.1 Mensuração de MDA (malondialdeído) via HPLC

As análises para implementação da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para mensurar MDA do fígado de animais, partiram de publicações científicas que detalhavam a técnica, conforme Mateos, *et al.*^[149]

Inicialmente, realizou-se a padronização e validação da técnica, analisando diferentes concentrações de malondialdeído (Merck[®]), 0,033; 0,1; 0,33; 1; 3,33 e 10 µg/mL MDA, em 3 dias consecutivos, medindo 3 vezes cada amostra por dia e observando sua estabilidade. Assim, com este procedimento, validou-se a metodologia, conforme preconizado pela ANVISA, que descreve: “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.)

Na FIGURA 26, observam-se cromatogramas referente à validação da metodologia de mensuração de MDA por HPLC descrita por Mateos, *et al.*^[149].

Os picos de MDA encontram-se sempre em um tempo de retenção próximo de 14 minutos, apresentando áreas dos picos crescentes conforme o aumento da concentração de MDA, estável e reprodutível durante todos os dias da validação.



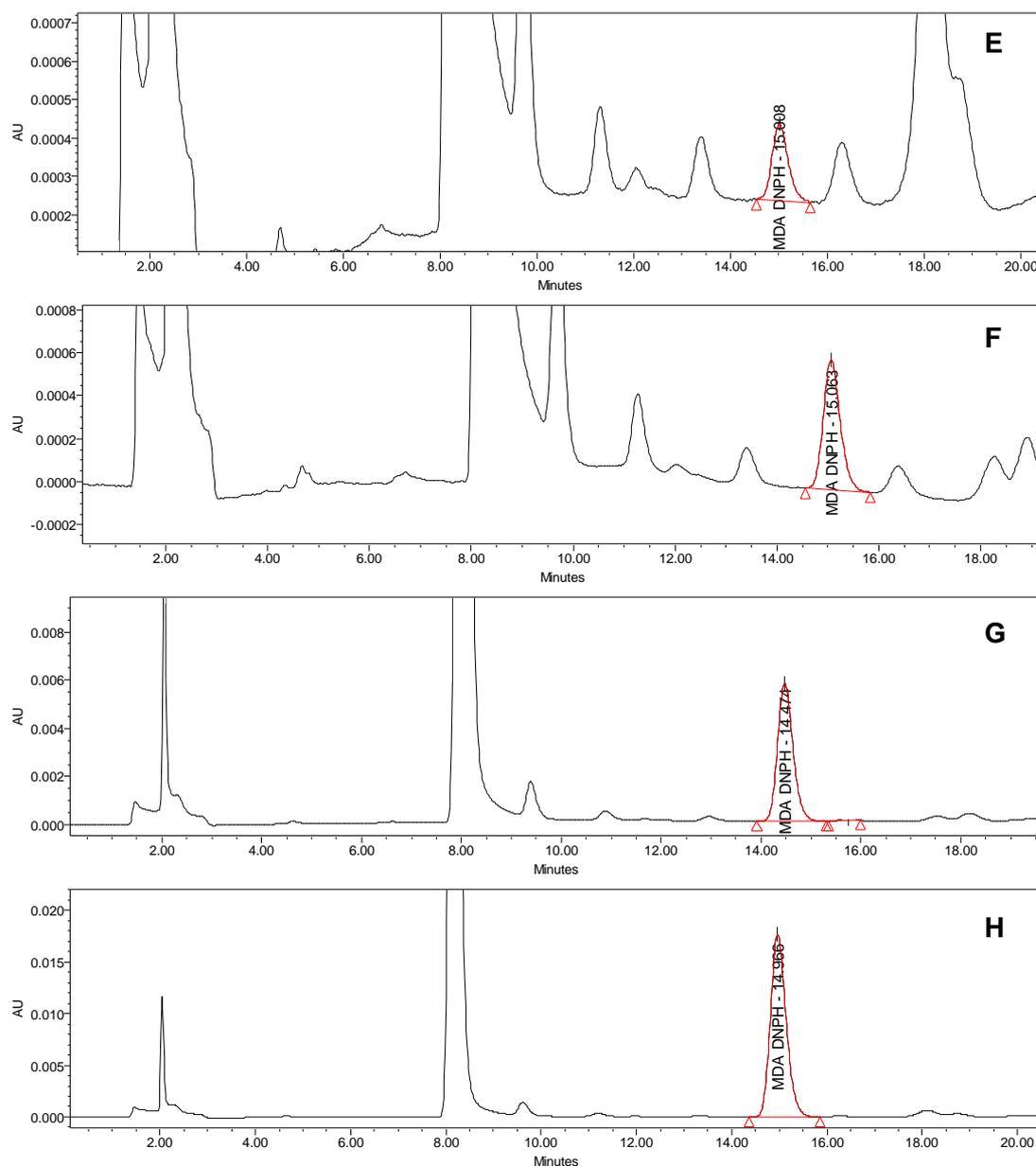


Figura 26. Cromatogramas de MDA

A)Água MilliQ + 25 μ L 2M HCl; **B)**Água MilliQ + 25 μ L 5mM DNPH + 2M HCl; **C)**0,033 μ g/mL MDA (0,11 nmol/mL); **D)** 0,10 μ g/mL MDA (0,32 nmol/mL); **E)**0,33 μ g/mL MDA(1,06nmol/mL); **F)** 1 μ g/mL MDA (3,19 nmol/mL); **G)**3,33 μ g/mL MDA (10,65 nmol/mL); **H)** 10 μ g/mL MDA (31,95 nmol/mL); todas as amostras acrescidas de 25 μ L 5mM DNPH + 2M HCl.

Foram calculadas as médias das 3 áreas de concentração nos 3 dias e feitas comparações entre elas (Área 1 vs Área 2 / Área 1 vs Área 3 / Área 2 vs Área 3) pelo Teste “t” de *Student* para amostras pareadas. Foi realizado um ajuste dos valores P pelo fato de se estar realizando comparações múltiplas (Ajuste de Bonferroni). Conforme verifica-se na FIGURA 27, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das áreas, com exceção do grupo 10µg/mL de MDA, que apresentou diferença entre a Área 3 comparativamente com as ocorrências nas Áreas 1 e 2.

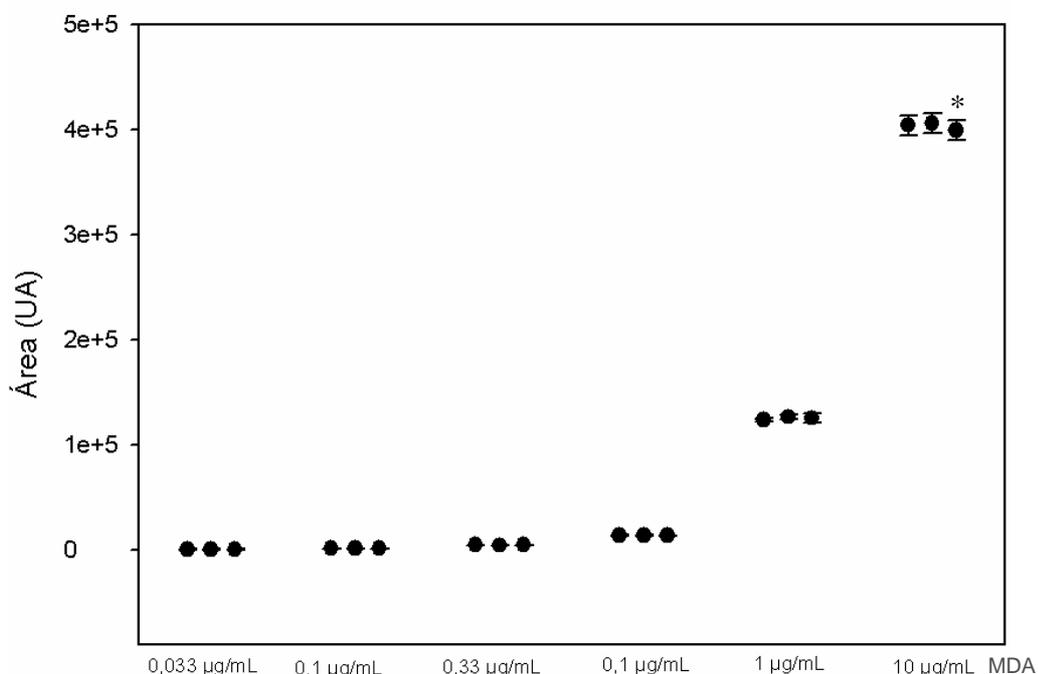


Figura 27. Diferenças médias e desvios padrão das médias para as áreas cromatográficas de concentração de MDA, tendo sido realizadas 3 mensurações por dia em 3 dias distintos para avaliar o método.

*Diferença significativa da área 3 para as áreas 1 e 2 da concentração de MDA de 10µg/mL.

Os fígados dos animais de todos os grupos, após homogeneização (Homog. 2) foram analisados por HPLC, seguindo a metodologia anteriormente validada, para detecção de MDA. Conforme os resultados contidos na FIGURA 28, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo DM em relação aos grupos controles; o grupo DM em relação ao grupo DM tratado por 5 dias; e o grupo DM20d em relação ao CO.

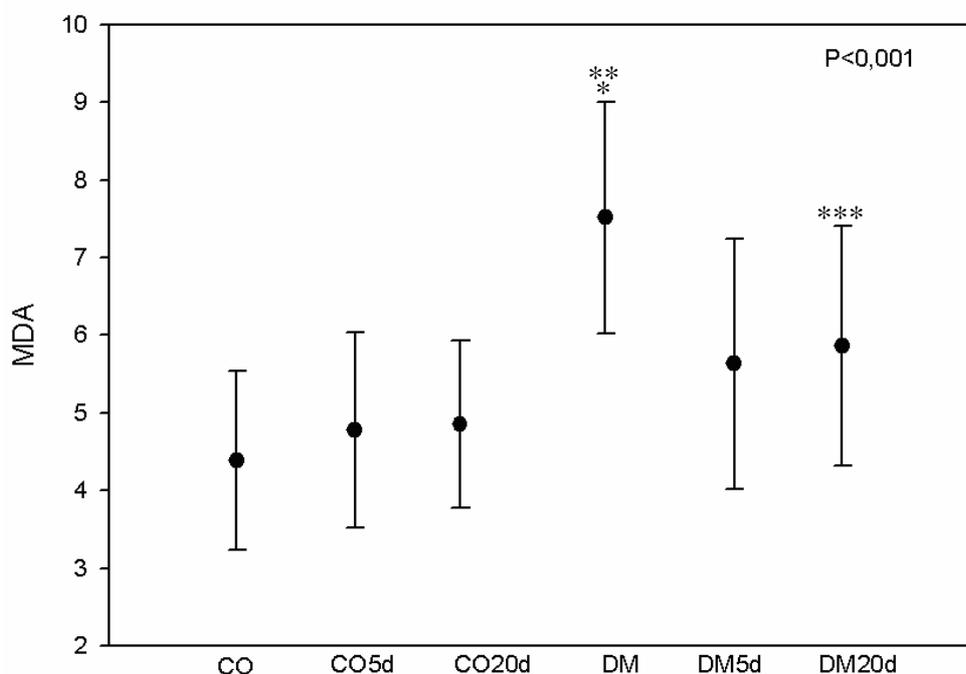


Figura 28. Médias \pm desvios padrão das médias para os níveis de Malondialdeído (nmol/mg proteína), para os grupos com $n=6$.

*Diferença significativa do grupo DM e CO, CO5d e CO20d ($p<0,001$).

**Diferença significativa do grupo DM e DM 5d ($p<0,001$).

***Diferença significativa do grupo DM20d e CO ($p<0,001$).

4.7.2 Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade da enzima glutathione peroxidase foi mensurada no dia da morte dos animais (*t60*). Apurou-se através dos resultados encontrados na FIGURA 29, que não houve diferença estatisticamente significativa para a GPx.

Tabela 10. Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx).

	CO	CO5d	CO20d	DM	DM5d	DM20d	P
GPx	102,84±32,40	117,38±16,47	121,27±31,13	128,85±17,39	125,14±22,86	108,98±30,64	0,354

Nota: Resultados expressos como média ± desvio padrão (nmol/mg prot.min).

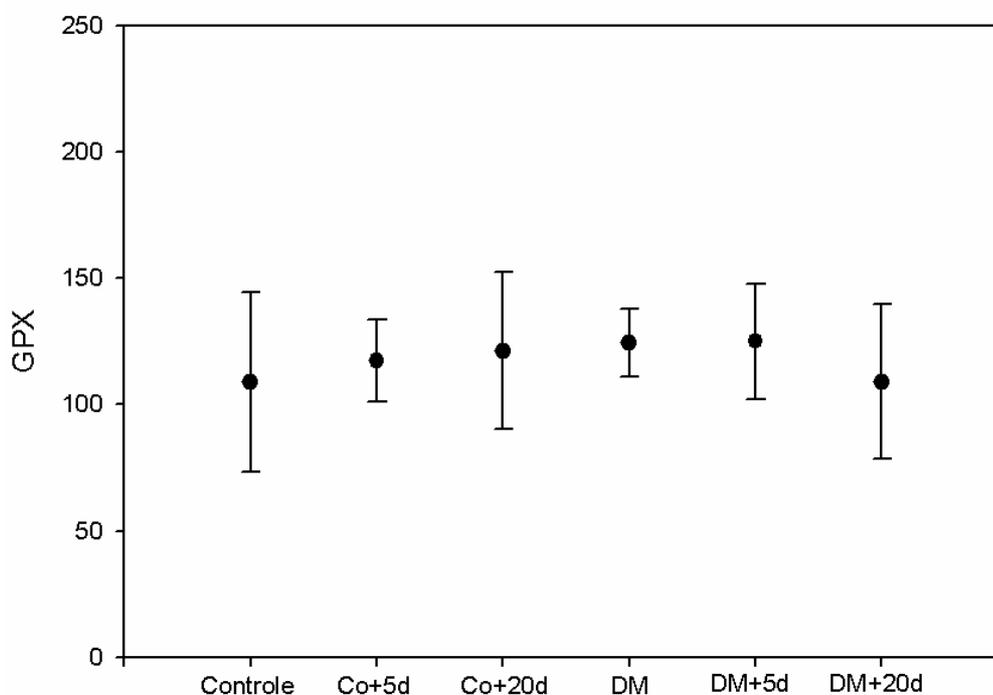


Figura 29. Médias ± desvios padrão das médias para os níveis de Glutathione Peroxidase, para os grupos com n=8.

DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

O Diabetes Mellitus configura-se hoje como uma epidemia mundial, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo^[25]. Nas estimativas da OMS, o número de portadores da doença no Brasil é cerca de 6 milhões e deve alcançar 10 milhões de pessoas em 2010^[25]. Segundo a International Diabetes Federation, a cada 2 minutos e 18 segundos, um novo caso de diabetes surge no Brasil^[152].

As conseqüências humanas, sociais e econômicas são devastadoras: são mais de 4 milhões de mortes por ano relativas ao diabetes e suas complicações (com muitas ocorrências prematuras), o que representa 9% da mortalidade mundial total^[25, 153].

O maior custo, entretanto recai sobre os portadores, suas famílias, seus amigos e comunidade, com o impacto da redução de expectativa de vida considerável. A expectativa de vida é reduzida em média em 15 anos para o diabetes tipo I e em 5 a 7 anos na do tipo II; os adultos com diabetes têm risco 2 a 4 vezes maior de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais. É a causa mais comum de amputações de membros inferiores não traumática, cegueira irreversível e doença renal crônica terminal. Em mulheres, é responsável por maior número de partos prematuros e mortalidade materna, segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil^[25].

A classificação do DM, desde o Consenso Brasileiro sobre diabetes, em 2002, se dá de acordo com sua etiologia e não mais por “insulino dependente” e “não insulino dependente”^[154]. Sendo nomeado DM tipo I, o caracterizado pela deficiência das

células β pancreáticas na produção ou secreção de insulina, com intensa participação de fatores genéticos e ambientais. Geralmente detectado em pessoas jovens e, se fazendo necessário, uso de insulina. O DM tipo II é caracterizado por uma resistência à captação da glicose no músculo esquelético e no tecido adiposo. Isso contribui para a hiperglicemia, manifestando-se predominantemente após os 40 anos e na grande maioria sem a necessidade de utilização de insulina exógena^[36].

As dificuldades no tratamento do diabetes (como por exemplo, a necessidade de várias injeções diárias de insulina para o controle glicêmico), a ocorrência de complicações crônicas da doença e o risco de hipoglicemias severas em pacientes com DM tipo I, já justificam, por si só, a pesquisa por estratégias terapêuticas alternativas à aplicação de insulina exógena. Além dos vários tipos de pesquisas que buscam soluções alternativas para o tratamento desta doença, atualmente é dada ênfase aos estudos que aprofundam o entendimento da patogenia desta doença^[47]. Os modelos animais têm-se mostrado bastante úteis para este fim^[155].

A utilização de modelos experimentais com processo patogênico semelhante ao humano, pode auxiliar no aprofundamento da compreensão do desenvolvimento do DM tipo I, assim como permitir o teste de novas modalidades terapêuticas^[31]. A estreptozotocina (STZ) é provavelmente a substância de escolha para estudar o Diabetes Mellitus tipo I em animais. Ela foi descrita em 1956 como um antibiótico de amplo espectro de ação^[156] e em 1960 sua atividade antitumoral foi relatada, principalmente para o tratamento de leucemia^[157]. Estudos de tumores com modelos animais (ratos) acabaram por descobrir que a STZ levava a hiperglicemia, e estudos em cachorros e macacos *rhesus* evidenciaram o seu potencial diabetogênico^[158]. Desde então, esta droga tem sido usada para induzir diabetes em modelos experimentais.

Muitos estudos realizados em animais puderam demonstrar os variados efeitos que a STZ pode ocasionar. Em estudos feitos por Dall'ago *et al.*^[159], foram observadas alterações na frequência cardíaca e pressão arterial, bem como na sensibilidade dos baro- e quimiorreceptores quando comparados animais diabéticos com animais do grupo controle. No presente estudo, aplicou-se 70mg/kg de STZ intraperitonealmente nos animais e a doença se desenvolveu em três dias. Eles

desenvolveram as principais características do DM como poliúria, polidipsia, hiperglicemia e perda de peso, semelhante aos achados de Ganong^[37] e Leiter^[160].

Pacientes diabéticos podem apresentar alterações hepáticas, como a esteatose, a esteatohepatite não- Alcoólica e a cirrose^[161]. As complicações vasculares representam a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos e ocorrem na micro e na macrovasculatura. A hiperglicemia pode aumentar a geração das espécies ativas de oxigênio através da auto-oxidação da glicose, pela ativação da proteína quinase C ou pelo aumento do metabolismo na via dos polióis^[162]. Em estudo experimental realizado por Melo^[53], utilizando estreptozotocina (STZ), ficou demonstrado que 18 horas após a indução do DM ocorreu dano nas células beta pancreáticas, provavelmente causado pelo desequilíbrio nos sistemas pró e antioxidantes. E, distúrbios na produção de oxidante e antioxidante, em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados danos oxidativos ou estresse oxidativo^[163].

Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento e/ou a propagação das reações oxidativas^[164].

Sendo assim, antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos. Eles protegem organismos aeróbicos do estresse oxidativo^[165]. E, a busca por substâncias antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos, por isso que cada vez mais os grandes centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas têm investido neste tipo de pesquisa^[118]. As plantas assim como os animais possuem sistemas antioxidantes. Dentre estes, destacam-se as substâncias como os terpenos oxidados, taninos, fenóis, alcalóides, lignanas, cafeína e aminas^[166, 167].

A sacaca (*Croton cajucara* BENTH) é uma planta medicinal e aromática, produtora de linalol, fixador de perfume em indústrias dos EUA, Inglaterra, França e Itália^[168]. Ao efetuar triagem em plantas de rápido crescimento e resistentes a pragas, Araújo *et al.*^[169] encontraram na sacaca 66,4% de linalol, e 25% de

sesquiterpenos, estes últimos com efeitos diversos, desde os anti-tumorais, bacteriostáticos, fungistáticos, bioinseticidas e na profilaxia da esquistossomose (impedindo a penetração das cercárias da *Biomphalaria glabrata* na pele humana). Foram isolados terpenóides, ácido aleurítico, triterpenóide e flavonóides^[170].

No presente estudo, avaliou-se o potencial antioxidante da casca do caule do *Croton cajucara* BENTH, onde se observou, através de análises cromatográficas por HPLC, utilizando o teste enzimático da Xantina Oxidase (FIGURA 14), a presença de atividade varredora ou redutora da formação de EAOs da planta, sendo dependente de volume e concentração do extrato aquoso utilizado (TABELA 1, FIGURAS 15, 16 e 17). Isso também é comprovado pelo coeficiente de correlação de Pearson que demonstra estatisticamente uma relação inversa entre a formação de dihidroxi-ácido-benzóico (DHBA) e a dose ou a concentração de EAC de CcB (TABELA 3) descrita através da Equação de Regressão Linear Múltipla com desfecho em DHBA (%) onde se pode observar que a cada uma variação percentual de concentração do EAC de CcB o nível de DHBA irá variar em -3,5% e que a cada uma variação de $\mu\text{L/mL}$ de dose o nível de DHBA irá variar em -0,10% (TABELA 2). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Larson, que demonstrando o potencial antioxidante de algumas espécies de crotons^[166]. Maciel isolou o flavonóide 3,7-di-O-metilcanferol presente no CcB, demonstrando também, a atividade antioxidante desse extrato^[15].

Os ensaios com células eucarióticas permitem a avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível e os resultados obtidos podem ser facilmente extrapolados para o homem. Desta forma, testes em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, assumem um importante papel na verificação da capacidade oxidante e antioxidante e na determinação do possível mecanismo de ação dos produtos testados^[138, 171]. Como demonstrado na FIGURA 18, os tratamentos realizados com diferentes volumes do extrato aquoso da planta *Croton cajuca* BENTH protegeram as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* contra os danos oxidativos provocados pelo H_2O_2 , sendo observada uma forte ação antioxidante, principalmente para o extrato da planta em maiores volumes. Este efeito protetor é evidenciado por um aumento na sobrevivência celular da maioria das linhagens, independente de defesa antioxidante

em falta. A partir disso, a atividade encontrada nestes extratos pode ser atribuída à presença de compostos, flavonóides, terpenóides^[87, 103, 107, 172] já descritos na literatura, que apresentam comprovada capacidade de seqüestrar radicais livres com grande eficiência.

Na presença de íons ferro, o H_2O_2 pode originar um dos intermediários mais reativos do oxigênio, o radical OH^\bullet através da reação de Fenton^[59]. Em condições aeróbicas de crescimento os mutantes *sod1* e *sod2* apresentam níveis maiores de ferro (até 5 vezes), assim como a duplo mutante *sod1sod2* (até 9 vezes), detectado por Ressonância Paramagnética de Elétron (EPR), em relação aos níveis basais da linhagem selvagem isogênica^[173]. Ensaio com as folhas do CcB também mostraram um aumento da taxa de sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* após a agressão com paraquat, bem como o tratamento realizado com outros antioxidantes naturais e sintéticos tais com a vitamina C ou o BTH^[171, 174]. Portanto, com base nos resultados obtidos nestes mutantes, pode-se sugerir uma possível ação dos compostos CcB sobre o radical OH^\bullet .

A definição de um antioxidante apresenta inúmeros conceitos que vem sendo atualizados com o passar dos tempos. Em 1974, o Dorland's Medical Dictionary^[175] apresenta "um antioxidante como uma de muitas substâncias sintéticas ou naturais que adicionadas a um produto para prevenir ou retardar a deteriorização pela ação do oxigênio do ar. Outra definição, segundo Parker e colaboradores em 1996, afirma que são substâncias as quais protegem tecidos biológicos do dano causado por radicais livres, os quais estão aptos para serem reciclados ou regenerados por redutores biológicos^[176]. Halliwell e Gutteridge, em sua última publicação (2007), reafirmam a proposta de uma nova e mais abrangente definição sendo "o antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com aquelas do substrato oxidável, decai significativamente ou previne a oxidação deste substrato"^[59].

Ao analisar-se os resultados desta investigação, verifica-se que na concentração de 10% nos maiores volumes tem-se uma redução na formação das EAOs de até $74,20 \pm 0,86\%$ e na de 5% chega-se a quedas de até $69,67 \pm 0,05\%$ (TABELA 1). Sendo assim, e seguindo a definição mais atual de antioxidantes e também pelas

referências do uso popular^[15, 103], definiu-se a concentração de 5% como a de escolha para o tratamento dos animais neste estudo.

Os animais estudados tiveram seus dados basais avaliados para a observação do comportamento entre os grupos e a existência de alguma interferência que pudesse se interpor aos dados finais. Conforme se verifica nos dados registrados na TABELA 4, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais controles e os grupos diabéticos para os níveis glicêmicos. Segundo os estudos com ratos diabéticos experimentais, os índices de glicemia destes ratos devem se apresentar acima de 250 mg/dL^[142], sendo que os animais diabéticos aqui investigados apresentaram média mínima no *t0* de 392,17±94,40 mg/dL de glicemia. O peso corporal dos animais neste período apresentou uma diferença estatística com a Análise de Variâncias ($p=0,34$), porém, devido a pequena variação de pesos, não houve poder estatístico para detectar qual o grupo apresentava tal diferença. Esta, não apresenta relevância clínica, pois os pesos corporais variaram entre a média mínima de 253,80±27,99 (DM) e 282,45±25,59 (CO20d) no *t0*.

Estudos histoquímicos em animais experimentais, como os desses grupos diabéticos investigados, sugerem que deva existir algum mecanismo de apoptose celular, pois as células beta pancreáticas são destruídas após a administração de estreptozotocina. Isso se deve, provavelmente, à diminuição da concentração da proteína tioredoxina, responsável pela neutralização dos radicais livres, ocorrendo, assim, a superprodução de EAO, que pode determinar a morte das células pancreáticas^[58].

A partir da indução do DM, uma quantidade de variáveis podem ser avaliadas no modelo experimental. Da mesma forma, Leiter^[160] afirma que quando os animais apresentam a glicosúria e hiperglicemia progressiva, ocorre polidipsia e poliúria, além de perda de peso corporal.

Após 60 dias de duração do presente estudo, o peso corporal dos animais dos grupos DM, DM5d e DM20d apresentaram redução em comparação aos grupos controles (TABELA 5). A perda de peso é um fator que pode ser indicativo da redução da saúde dos animais, decorrente do procedimento experimental^[48]. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre as

diferenças das médias dos t_{60} e t_0 para os pesos corporais dos grupos CO, CO5d e CO20d (FIGURA 19). Estes animais obtiveram aumento na variação de seus pesos, sendo o grupo CO20d aquele que apresentou maior ganho. Esse comportamento também foi verificado nos estudos de Dias^[19] que demonstrou diminuição do peso corporal dos ratos diabéticos comparados com os controles e isso pode ocorrer em animais que permanecem por período prolongado em jejum, pois o glicogênio hepático está diminuído, e o glicerol é convertido em glicose. Como esse mecanismo é muito limitado, o substrato para a formação da glicose sangüínea é composto pelas proteínas, justificando, assim, a diferença encontrada.

Estudos suportam a idéia de que há aumento na formação da uréia, quando instalado o DM, bem como diminuição da incorporação do aminoácido leucina no plasma e no fígado desses animais. O grau de incorporação pode estar reduzido em torno de 50% quando comparados a animais sem a doença^[161]. No estudo de McNurlan e Garlick^[177], a hipótese de que a síntese das proteínas pode estar diminuída foi confirmada, em aproximadamente, 50% nos animais diabéticos, além de constatar diminuição nos níveis da síntese protéica por unidade de RNA. A provável causa da diminuição nos níveis da síntese protéica pode estar relacionada com a degradação do retículo endoplasmático^[161].

Sendo a hiperglicemia uma das características encontradas em portadores do DM, verificaram-se os índices quando a doença foi instalada (após a indução) e após os 60 dias do estudo. Segundo os dados referentes à TABELA 6 e FIGURA 20, não foi observada alteração significativa entre o tempo zero e o tempo 60 dias dentre os grupos ($P_{tempo}=0,303$). Mesmo nos animais diabéticos tratados, esta constante se manteve, demonstrando apenas uma tendência na redução da glicemia. Pode-se observar somente uma diferença de zero estatisticamente significante no grupo CO entre a diferença das médias do T_{60} e T_0 (Delta ou Δ). Estes dados vão contra aos relatos dos benefícios do *Croton cajucara* BENTH, em sua grande maioria derivados do empirismo e não estudos biofitoquímicos^[15, 100]. Rosa^[178], em seus estudos com CcB e animais diabéticos, também encontrou resultados semelhantes, sendo os grupos diabéticos e diabéticos tratados com CcB somente diferentes estatisticamente do grupo controle.

A hiperglicemia e hipercolesterolemia diabética constituem um processo responsável pela elevada morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos^[179]. Pelos resultados analisados na TABELA 7 e FIGURA 21, que dizem respeito a colesterolemia, verificou-se que houve uma variação entre as diferenças das médias do tempo final comparado com o inicial, mostrando um aumento do delta (Δ) para todos os grupos diabéticos, sendo significativo para os grupos DM e DM5d. Analisando as médias dos níveis colesterolêmicos, pôde-se ver que mesmo com o tratamento com CcB, não houve redução destes níveis no decorrer do tempo do estudo. Os relatos do estudo de SOARES^[180], sobre os níveis de colesterol plasmático em ratos diabéticos tratados por infusão de duas plantas usadas na medicina popular, *Syzygium jambolanum* e *Bauhinia candicans*, demonstrou aumento moderado, não sendo observado efeitos no tratamento com as plantas.

A relação entre o diabetes e o colesterol se dá pelas lipoproteínas, que são compostos hidrossolúveis formados por fosfolipídeos, colesterol e triglicerídeos, associados a proteínas, as chamadas apolipoproteínas. Quanto maior o componente protéico das lipoproteínas, maior é a sua densidade. As lipoproteínas são transportadoras de gordura pelo sangue. Elas são classificadas em quilomícrons, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). A LDL contém a maior densidade do colesterol que é transportado aos tecidos periféricos, podendo depositar o excedente de colesterol nas artérias. Já a HDL, conhecida como fator protetor contra o excesso de colesterol, capta o colesterol livre periférico, impedindo, assim, o aumento do colesterol total e exercendo efeito protetor contra doenças cardiovasculares^[181].

Sabe-se que a LDL ao estar elevada em diabéticos, há maiores riscos de desenvolvimento de doença cardiovascular. O diabetes está comumente acompanhado de LDL aumentada^[181, 182]. O aumento da LDL pode estar associado à resistência insulínica^[183].

Refere-se também, que níveis elevados de triglicerídeos são observados em pacientes com Diabetes Mellitus^[184]. Segundo os resultados da TABELA 8, todos os grupos iniciaram com médias de triglicerídeos semelhantes, porém ao final do estudo, o grupo DM apresentou um grande aumento ($P_{tempo} < 0,001$). Este mesmo

grupo apresentou uma diferença entre as suas médias (Δ) estatisticamente diferente de zero (FIGURA 22). Os estudos de Nogueira Junior^[184] também demonstram que os níveis séricos de triglicerídeos em ratos induzidos por STZ apresentaram um aumento significativo para o grupo diabético em relação aos demais grupos. Os grupos DM5d e DM20d apresentaram uma tendência de redução quando comparados ao grupo DM (t60), mesmo não sendo estatisticamente significante, e se aproximando dos valores dos grupos controles. Dados de Gao *et al.* também demonstraram redução nos níveis de triglicerídeos em ratos diabéticos tratados com *Córtex Lycii Radici*, uma planta utilizada tradicionalmente pela medicina oriental^[185].

Considerando que o Diabetes Mellitus resulta no aumento da lipólise no tecido adiposo, aumentando os níveis de ácidos graxos sanguíneos haverá uma maior produção de corpos cetônicos pelo fígado. Entretanto, o ácido graxo em excesso captado pelo fígado não será totalmente oxidado a corpos cetônicos pela cetogênese. Assim este excesso de ácido graxo será direcionado para a síntese de triglicerídeos que serão transformados em VLDL. Então, as VLDLs em excesso não serão depuradas pela lipase lipoprotéica, havendo a instalação de uma hipertrigliceridemia. Além disso, a quantidade desta enzima é dependente do nível de insulina no sangue, o que reforça o quadro de hipertrigliceridemia em condição de Diabetes Mellitus^[186].

Outras importantes alterações são detectadas em indivíduos portadores de DM. É o caso das enzimas de integridade hepática (aminotransferases), como: AST (aspartato-aminotransferase), ALT (alanina-aminotransferase) e da FA (Fosfatase Alcalina)^[187].

As aminotransferases são enzimas que catalisam especificamente a reação de transaminação (transferência de um grupo amina de um aminoácido para um ácido α -cetônico, para formar um novo aminoácido e um novo ácido α -cetônico). Exemplos como a aspartato-aminotransferase (AST, anteriormente designada TGO - transaminase glutâmica oxalacética) e alanina-aminotransferase (ALT ou TGP - transaminase glutâmica pirúvica) estão amplamente distribuídas nas células, especialmente no fígado e no miocárdio, além de estarem presentes nos rins e músculo esquelético, mas sua taxa sanguínea é baixa. Esta taxa se eleva consideravelmente em caso de lesões celulares^[188].

A ALT é uma enzima presente nos hepatócitos. Quando uma célula é danificada, ela libera esta enzima no sangue, onde é medida. A ALT aumenta drasticamente em lesões hepáticas agudas, como na hepatite viral ou overdose de paracetamol ou outras drogas. As elevações são geralmente medidas em múltiplos do limite máximo do normal (ULN). A AST é similar à ALT de modo que é outra enzima associada às células parenquimais do fígado. Apresenta-se aumentada em número na lesão hepática aguda, mas também está presente nas hemácias e músculos esqueléticos e cardíacos, não sendo então uma enzima específica do fígado. A proporção entre a AST e a ALT é às vezes útil para diferenciar as causas da lesão hepática^[188].

Fosfatase Alcalina é uma hidrolase, isto é, é uma enzima capaz de remover grupos fosfatos de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides; como o próprio nome sugere, essa enzima é mais ativa em soluções alcalinas. O processo de remoção desses grupos fosfatos é conhecido como defosforilação. A fosfatase alcalina é produzida por diversos órgãos e tecidos, como por exemplo: ossos, fígado e placenta. É uma enzima presente nas células que delineiam os ductos biliares do fígado. Os níveis de FA no plasma irão aumentar com grandes obstruções do ducto biliar, colestase intra-hepática ou doenças infiltrativas do fígado^[188].

Na presente investigação se verifica uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, no tempo 60 dias, para as aminotransferases ALT ($p=0,001$) e FA ($p<0,001$), conforme a TABELA 9. O grupo de animais diabéticos (DM) apresentou diferença estatística comparado aos grupos controles e ao grupo DM5d, apresentando este, uma redução nos valores de ALT porém, não retornando aos níveis de controle. Tal fato também ocorre com os níveis de FA, onde os grupos diabéticos apresentaram-se diferentes estatisticamente dos grupos controles e o grupo DM5d apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos DM e DM20d, porém não se aproxima aos valores dos grupos controles. Não se observou diferença estatística para médias dos níveis de AST entre os grupos, somente uma tendência de aumento no grupo DM (FIGURA 23). Foi percebida uma diferença estatística significativa para as médias de ALT entre o grupo DM comparado com os grupos controles como mostra a FIGURA 24 ($p<0,005$). Os grupos diabéticos tratados com CcB apresentaram uma tendência de queda nos

seus níveis, principalmente no grupo DM5d comparado ao DM. E, as médias dos níveis de FA (FIGURA 25), apresentaram uma diferença significativa estatisticamente dos grupos DM e DM20d para com os grupos controles ($p < 0,001$) e entre o DM5d com os grupos DM e DM20d, apresentando-se aquele reduzido em comparação a estes ($p < 0,001$). Em todas as análises das aminotransferases, não foram observadas alterações nos grupos controles.

Estes dados se assemelham aos encontrados por Egesie^[189] em seus estudos com a administração do extrato aquoso da folha *Ocimum gratissimum*, planta tradicional da medicina nigeriana, causando uma redução estatística significativa no nível de glicose do plasma em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e, evidenciando níveis altos de AST e ALT no plasma dos ratos diabéticos, com redução após o tratamento.

Os aumentos das médias das enzimas ALT e FA, detectados no grupo diabético da presente investigação, podem estar relacionados ao acúmulo de gordura no fígado destes animais e devido à presença de vacúolos de gordura no citoplasma das células hepáticas. Trata-se da esteatose hepática não alcoólica, uma doença reconhecida cada vez mais como uma das causas principais da doença de fígado crônica^[190]. Estes testes bioquímicos são usados para exames complementares para o diagnóstico da doença^[191]. O risco da doença crônica de fígado é mais elevado nos diabéticos, e o nível alanina-aminotranferase no plasma é um indicador sensível de mortalidade da doença de fígado^[192]. Hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipotireoidismo e Diabetes Mellitus também se associam a níveis aumentados de ALT^[193].

Apesar dos relatos de hepatite tóxica notificados devido ao uso do CcB^[15], nos grupos controle tratados com a Sacaca, não se observou aumento significativo nos índices das transaminase, sugerindo através deste teste bioquímico, integridade hepática. O fator de instalação da hepatite tóxica por CcB, ocorridos em muitos casos no Brasil e mencionado na introdução deste trabalho, pode ser devido ao uso prolongado e em dosagens muito concentradas deste chá pela população.

Observou-se também uma diminuição estatisticamente significativa no grupo DM tratado por 5 dias com CcB comparado ao grupo DM para a enzima FA e uma

tendência de diminuição para as enzimas AST e ALT. Isso pode ser explicado pela ação antioxidante do EAC *Croton cajucara* BENTH, conforme os dados das TABELAS 1, 2 e 3 e das FIGURAS 15, 16 e 17. Hiruma-Lima^[14], através de seus estudos, demonstrou que o CcB possui um efeito protetor em diferentes modelos de úlcera experimental em ratos, sendo esta atividade desencadeada pela estimulação na síntese de prostaglandinas causada por antioxidantes^[14, 118, 194].

Os radicais livres, mediando a citotoxicidade e a peroxidação lipídica, são associados com o envelhecimento das células e as doenças crônicas tais como o câncer, Diabetes Mellitus, aterosclerose ou inflamação^[149]. Um importante passo na degradação das membranas celulares é a reação das Espécies Ativas de Oxigênio com as ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados, gerando hidroperóxidos lipídicos. No dano de tais hidroperóxidos, uma variedade de grandes aldeídos pode ser formada^[73]. O malondialdeído (MDA), um composto formado pela cisão de ácidos graxos poli-insaturados peroxidados, é um dos principais produtos da peroxidação lipídica^[74]. O MDA é reativo para os grupos amino das proteínas e ácidos nucleicos, ao qual foi inferido ter efeitos mutagênicos e citotóxicos, e possivelmente participar na geração de aterosclerose^[75]. Desde que o MDA foi encontrado em níveis elevados nas doenças relacionadas aos danos dos radicais livres, ele foi utilizado extensamente como um índice de lipoperoxidação nas ciências biológicas e médicas^[75].

O estudo dos mecanismos envolvidos nos danos celulares mediados por compostos oxidantes é importante, assim como a avaliação dos biomarcadores do estresse celular em tais circunstâncias, pois contribui e pode ajudar extremamente a impedir o surgimento e o desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo^[195].

Neste trabalho, foi projetado e implementado uma metodologia, viável ao nosso laboratório, para mensurar MDA derivatizado com DNPH por HPLC (FIGURA 26), com base e referência descrita inicialmente por Mateos^[149]. Foram realizadas a padronização e a validação da técnica, avaliando concentrações conhecidas de MDA. Conforme se observa na FIGURA 27, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias das áreas dos picos cromatográficos, referentes às concentrações de MDA medidas em triplicatas, um vez por dia, durante três dias.

Houve uma diferença apenas entre a média da Área 3 e as duas outras áreas da concentração de MDA de 10µg/mL. Esta variação pode ser explicada por um erro não intencional de pipetagem em uma das amostras que compôs a média da concentração do 3º dia, resultando no desvio da média. Entretanto, esta variação não interfere na validação do método, pois todas as outras médias de concentração nos três dias apresentaram um comportamento constante e esperado.

O homogeneizado de fígado dos animais estudados foi avaliado por esta metodologia e, conforme a FIGURA 28, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa para o grupo diabético (DM), em comparação aos grupos controles (CO, CO5d e CO20d). O aumento da glicemia está diretamente associado ao aumento de EAO em outros tecidos. Esse excesso de glicose pode causar a glicação (processo que consiste na adição de glicose na porção N-terminal da cadeia protéica e dos aminoácidos dentro da cadeia^[196]) de proteínas, processo este conhecido como “Reação de Maillard”^[197]. Nesse processo, a molécula de glicose pode sofrer uma oxidação por EAOs, formando os produtos avançados da glicação, chamados também de AGEs (Advanced glycation end-products)^[59]. A glicação de proteínas pode levar à inativação de enzimas, incluindo as enzimas do sistema antioxidante do organismo^[90].

Outra consequência do excesso de glicose no sangue é de a molécula sofrer uma auto-oxidação, através da enolização, gerando um radical enediol. Este radical transfere elétron não pareado a uma molécula de O₂, gerando um ânion superóxido e uma dicarbonila que ligará duas cadeias protéicas, formando uma ligação cruzada e inativando-as^[43, 59]. A enolização da molécula de glicose tem como consequência o aumento na geração de EAOs, que pode levar a uma peroxidação lipídica conduzindo à formação de malondialdeído^[59]. Esta pode ser a justificativa plausível que levou ao aumento dos níveis de MDA no grupo DM neste trabalho investigativo.

Mateos^[149], em seus estudos, também encontrou níveis semelhantes de MDA em ratos diabéticos. Yokozawa^[198] registrou níveis entre 3 e 8 nmol/mL de MDA no plasma de ratos, conforme os níveis também encontrados nas análises da presente investigação.

Segundo ele, a utilização de antioxidantes é considerada benéfica devido ao seu potencial protetor contra o desenvolvimento de múltiplas doenças associadas ao estresse oxidativo. Um exemplo são os flavonóides, presentes nas plantas, que exibem uma forte atividade biológica varredora de radicais livres. Eles podem inibir a lipoperoxidação e a atividade enzimática de sistemas como o da lipoxigenase e cicloxygenase, processos associados à doença cardiovascular^[149].

Os resultados da FIGURA 28 também demonstram uma queda dos níveis de MDA nos grupos diabéticos tratados, demonstrando a provável ação antioxidante do *Croton cajucara* BENTH, que foi anteriormente demonstrada *in vitro*. Rosa^[178] observa aumento das substâncias ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos grupos diabético e tratado por um período de 20 dias com o CcB, sugerindo uma ação pró-oxidante da planta. Nos resultados encontrados neste presente estudo, verifica-se um aumento do grupo DM20d em relação ao grupo CO, porém registrando-se com valores inferiores ao grupo DM. Os grupos controles tratados por 5 e 20 dias apresentaram somente uma tendência de aumento das médias de MDA, porém não estatisticamente significativa.

Como o estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a geração das espécies ativas de oxigênio (e/ou nitrogênio) e a capacidade de defesa corporal, tanto endógena quanto exógena, e sendo o sistema de defesa antioxidante enzimático um dos componentes mais ativos deste complexo, foram avaliados os níveis da enzima glutathione peroxidase (GPx) nos fígados dos ratos deste estudo em apreço.

As peroxidase são enzimas que utilizam uma variedade de redutores celulares para inativar peróxidos^[199]. Em mamíferos, as principais peroxidases são as glutathione dependentes, como por exemplo a GPx, sendo a principal defesa contra o H₂O₂ na mitocôndria, já que esta organela, de maneira geral, não apresenta a enzima catalase. Há um consenso sobre as mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes de diferentes órgãos em ratos diabéticos^[200]. Embora alguns estudos mostrem que a atividade das enzimas SOD, catalase e glutathione peroxidase no Diabetes Mellitus seja reduzida^[200-202], outros autores apontam para o aumento da atividade em ratos diabéticos induzidos por STZ^[203, 204]. Essa aparente contradição

pode ser devida à especificidade do tecido, variações na severidade ou duração da doença, ou outras condições experimentais^[205].

No presente estudo, conforme se observa na TABELA 10 e na FIGURA 29, não se verifica diferença estatisticamente significativa para a atividade da enzima GPx. As enzimas SOD e catalase, para estes mesmos grupos de animais, já foram avaliadas pelo nosso grupo de pesquisa, por Rosa^[178], demonstrando um aumento da atividade da superóxido dismutase no grupo DM comparado ao CO, provavelmente em decorrência da dismutação do íon superóxido que está elevado quando do estresse oxidativo^[206]. Houve uma redução da atividade nos diabéticos após administração de CcB nos grupos de 5 e 20 dias, sugerindo uma atividade antioxidante da planta. Já na enzima catalase, não houve diferença estatisticamente significativa, devido, provavelmente, a uma menor formação de peróxido de hidrogênio pela ação da SOD aumentada^[178].

A atividade da catalase apresenta-se com um maior espectro do que a da glutathione peroxidase para o H_2O_2 , implicando na detoxificação, quando em concentração elevada, enquanto a GPx atua em baixas concentrações deste peróxido. Em órgãos que possuem atividade elevada de catalase, como é o caso do fígado, a concentração de peróxido de hidrogênio é menor^[7]. Esta, pode servir como explicação para a falta de diferença estatística dos níveis de GPx nos nossos grupos estudados, quando se detecta a existência predominante de outras vias na depuração das EAOs, sendo provável a ação da superóxido dismutase.

Pelos resultados expostos e discutidos neste trabalho, tendo em vista os objetivos do estudo dos efeitos do extrato aquoso da casca do caule de *Croton cajucara* BENTH em ratos diabéticos e seu provável potencial antioxidante, podem-se inferir as conclusões que seguem.

CONCLUSÃO



CONCLUSÃO

Mediante o que foi estudado bibliográfica e experimentalmente, tendo como elementos os objetivos propostos, mais uma vez orientados para a conclusão deste trabalho, registra-se que:

- O extrato aquoso da casca do *Croton cajucara* BENTH, a partir do ensaio enzimático da Xantina Oxidase por HPLC apresentou capacidade antioxidante dependente de volume e concentração.

- Na avaliação *in vivo*, utilizando a linhagem de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* proeficiente e deficiente no sistema de defesa antioxidante da enzima superóxido dismutase tratadas com EAC de CcB, existiu um aumento na sobrevivência celular, sendo significativa em doses alta do extrato da planta, demonstrando seu potencial antioxidante.

- Os pesos corporais dos animais diabéticos apresentaram-se reduzidos em comparação aos controles e o EAC de CcB não apresentou nenhum efeito quanto a este parâmetro.

- Os níveis glicêmicos, colesterolêmicos e triglicéricos dos ratos diabéticos tratados mostraram apenas uma tendência de redução, sendo que o grupo DM tratado por 5 dias apresentou maior redução, apontando para um efeito antioxidante do CcB no uso agudo.

- As provas de integridade hepática para os grupos controles tratados apresentaram-se inalteradas, mas às dos grupos diabéticos tratados apresentaram redução nos níveis de alanina-aminotransferase e fosfatase alcalina, tendo, esta

última, uma redução significativa no grupo DM 5d em relação ao diabético, demonstrando a ação antioxidante do CcB em um tratamento de 5 dias.

- A metodologia para medir o marcador de lipoperoxidação, malondialdeído, por cromatografia líquida de alta eficiência foi implantada, padronizada e validada, demonstrando uma queda dos níveis de MDA nos grupos diabéticos tratados, acreditando-se que o CcB esteja agindo com antioxidante e revertendo o quadro lipoperoxidativo.

- A enzima glutathiona peroxidase não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados.

Tendo em vista os resultados obtidos, neste presente estudo, podemos concluir que o extrato aquoso da casca do caule de *Croton cajucara* BENTH possui ação antioxidante nos modelos propostos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, em ratos diabéticos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nathan, D., J. Meigs, and D. Singer, *The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is, or is it?* Lancet, 1997. 350(1): p. 14-19.
2. SAÚDE., M.D. (1996) *Ministério da Saúde: Diabetes mellitus: guia básico para diagnóstico e tratamento*. Volume,
3. Asbun, J. and F.J. Villarreal, *The Pathogenesis of Myocardial Fibrosis in the Setting of Diabetic Cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. 47(4).
4. Halliwell, B., *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radic Res, 1999. 31(4): p. 261-72.
5. Mehta, J.L., et al., *Oxidative stress in diabetes: A mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2006. *in press*.
6. Atli, T., et al., *Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients*. Archives of Gerontology & Geriatrics, 2004. 39(3): p. 269-275.
7. Salvador, M. and J.A. Henriques, *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. 2004, Canoas: Ed. da Ulbra.
8. Halliwell, B., *Free radicals and metal ions in health and disease*. Proc Nutr Soc, 1987. 46(1): p. 13-26.
9. van Acker, S.A., et al., *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*. Free Radic Biol Med, 1996. 20(3): p. 331-42.
10. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radic Biol Med, 1997. 22(5): p. 749-60.
11. Peres, W., et al., *The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction*. J Hepatol, 2000. 33(5): p. 742-50.
12. Day, A., et al., *Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasm metabolites of quercetin*. Free Radicals Research, 2001. 35: p. 941-952.
13. Costa, M., et al., *Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo. Part II*. J Ethnopharmacol, 1989. 27(1-2): p. 25-33.
14. Hiruma-Lima, C.A., et al., *Gastroprotective effect of essential oil from Croton cajucara BENTH. (Euphorbiaceae)*. J Ethnopharmacol, 2000. 69(3): p. 229-34.
15. Maciel, M.A.M., et al., *Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares*. Quim. Nova, 2002. 25(3): p. 429-438.
16. Karatas, F., M. Karatepe, and A. Baysar, *Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem., 2002. 311(1): p. 76-9.

17. Collins, C.H., G.L. Braga, and P.S. Bonato, *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 1993, Campinas: Unicamp.
18. Mannervik, B., *Methods in Enzymology: Glutathione peroxidase*. Academic Press. Vol. 113. 1985, New York.
19. Dias, A.S., *O Antioxidante Quercetina diminui o Estresse Oxidativo hepático em ratos diabéticos.*, in *PPg em Ciências Biológicas: Fisiologia*. 2005, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. p. 111.
20. Cingolani, H. and A. Houssay, *Fisiologia Humana de Houssay*. 7 ed. 2004, Porto Alegre: Artmed.
21. Galbo, H., *Exercise and diabetes*. Scand J Sports Sci, 1988. 10(3): p. 89-95.
22. Oliveira, R.F., *Diabetes Dia-a-Dia: guia para o diabético, seus familiares, amigos e membros das equipes de saúde.* , ed. 2. 2002, Rio de Janeiro: Revinter.
23. SILVERTHORN, D.V., *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 2 ed. 2003, São Paulo: Manole.
24. Harris, M. and G. Cahill, *Members of NIH diabetes data group workshop: a draft classification of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance*. Diabetes, 1978. 27: p. 1112-1125.
25. Ministério da Saúde, B., *Diabetes Mellitus*. . Caderno de Atenção Básica. Secretaria de Atenção à Saúde, 2006. n. 16: p. 64.
26. DIABETOLOGIA., S.P.D. (2006) *Definição, diagnóstico e classificação da DM*. Volume,
27. Thompson, K.H. and D.V. Godin, *Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes*. Nutrition Research, 1995. 15: p. 1377-1410.
28. Bauer, A.C., *Avaliação do estresse oxidativo e do efeito citoprotetor de tocoferóis sobre a viabilidade de ilhotas pancreáticas submetidas ao processo de isolamento.*, in *Clinica Médica e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina*. 2005, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. p. 130.
29. Wild, S.H., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030: response to Rathman and Giani*. Diabetes Care, 2004. 27: p. 2568-2569.
30. Gruber, W., et al., *The economics of diabetes and diabetes care*. World Health Organisation. 1998, Brussels: International Diabetes Federation. 136.
31. Kirsten, V.R., *Caracterização do modelo experimental NOD (nonobese diabetic) em ambiente convencional.*, in *Medicina e Ciências da Saúde: Nefrologia*. 2006, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. p. 103.
32. Ferreira, S.R.G., et al., *Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil*. Diabetes Care, 2000. 16: p. 701-704.
33. Campos, J.J.B., et al., *Incidência de Diabetes mellitus insulino-dependente (Tipo1) na cidade de Londrina, PR, Brasil*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo, 1998. 42: p. 36-44.
34. Keen, H., *The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*. Health Trends, 1994. 26: p. 41-43.
35. Nathan, D.M., *Long-term complications of Diabetes mellitus*. Journal of Medicine, 1993. 328: p. 1676-1685.

36. Milech, A. and J.E.P. Oliveira, *Diabetes mellitus – clinica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar*. 2004, São Paulo: Atheneu.
37. Ganong, W.F., *Review of Medical Physiology* ed. t. ed. 1995: McGraw-Hill Professional. 928.
38. Dias, A.S., *Avaliação da Lipoperoxidação e do fluxo sangüíneo na artéria mesentérica de ratos diabéticos por indução de estreptozotocina.*, in *PPG Ciências Biológicas: Fisiologia*. 2000, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. p. 69.
39. Boundy, J.O., *Enfermagem médico-cirúrgica*. 2004, Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores.
40. Low, P.A., K.K. Nickander, and H.J. Tritschler, *The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy*. *Diabetes*, 1997. 46: p. 385-425.
41. Baynes, W., *Chemical modification of protein by lipids in diabetes*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003. 41: p. 1159-1165.
42. Wolff, S.P. and R.T. Dean, *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes*. *Biochemistry Journal*, 1987. 245: p. 243-250.
43. Wolff, S.P., Z.Y. Jiang, and J.V. Hunt, *Protein glycation and oxidative stress in Diabetes mellitus and ageing*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991. 10: p. 339-352.
44. Cameron, N.E., et al., *Effects of alpha-lipoic acid on neuro-vascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids*. *Diabetologia*, 1998. 41: p. 390-399.
45. van Dan, P.S., *Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives*. *Diabetes/metabolism Research and Reviews*, 2002. 18: p. 176-184.
46. Balda, C.A. and A. Pacheco-Silva, *Aspectos imunológicos do diabetes mellitus tipo 1*. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 1999. 45: p. 175-80.
47. Parslow, T.G., et al., *Imunologia Médica*. 2000, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 702.
48. Andersen, M.L., et al., *Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de experimentação*. 2004, São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. 179.
49. Andrade, A., S.C. Pinto, and R.S. Oliveira, *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*. 2002, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
50. Mezdari, T.J., V.A. Tomáz, and V.L.L. Amaral, *Animais de laboratório:cuidados na iniciação experimental*. 2004, Florianópolis: Editora UFSC.
51. Pickup, J.C. and C. Williams, *Textbook of diabetes*, ed. 2nd. 1997, London: Blackwell Scientific Publications.
52. Hounsom, L. and D.R. Tomlison, *Does neuropathy develop in animal models?* *Clinical Neuroscience*, 1997. 4: p. 380-389.
53. Melo, D.A.S., *Comparação e análise da expressão do fator de ativação núcleo Kappa B (NFkB) e da eletrogastrografia em ratos normais e diabéticos*. , in *PPG Ciências Biológicas: Fisiologia*. 2001, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre. p. 98.

54. Yamamoto, H., Y. Uchigata, and H. Okamoto, *Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP - ribose) synthetase in pancreatic islets*. *Nature*, 1981. 294: p. 284-286.
55. Uchigata, Y., et al., *Effect of poly (ADPribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis*. *Diabetes*, 1983. 32: p. 316-318.
56. Robbins, M.J., et al., *Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase*. *Diabetologia*, 1980. 18: p. 55-80.
57. Like, A.A. and A.A. Rossini, *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of Diabetes mellitus*. *Science*, 1976. 193: p. 415-417.
58. Hotta, M., E. Yamato, and J. Miyazaki, *Antioxidants in diabetes management*. *Oxidative stress and pancreatic B-cell destruction in insulin dependent diabetes mellitus*. 2000, New York: Marcel Dekker Ed.
59. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. Biosciences. 2007, Oxford, New York: Oxford University Press. 851.
60. Campbell, M., *Bioquímica*. 2000, Porto Alegre: Artmed. 753.
61. Augusto, O., *Radicais Livres: bons, maus e naturais*. 2006, São Paulo: Oficina de Textos. 115.
62. Barreiros, A.L.B.S., J.M. David, and J.P. David, *ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO*. *Quim. Nova*, 2006. 29(1): p. 113-123.
63. Husain, S.R., J. Cillard, and P. Cillard, *Phytochemistry*, 1987. 26: p. 24-89.
64. Boveris, A., et al., *Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1757(5-6): p. 535-42.
65. Maxwell, S.R., *Prospects for the use of antioxidant therapies*. *Drugs*, 1995. 49(3): p. 345-61.
66. Meneghini, R.A., *Toxicidade do Oxigênio*. *Ciência Hoje*. 5: p. 28.
67. Cohen, M., *Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?* *Ann Intern Med*, 1989. 111: p. 918-31.
68. Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge, and C.E. Cross, *J. Lab. Clin. Med.*, 1992. 119: p. 598.
69. Yokozawa, T., et al., *Magnesium lithospermate B suppresses the increase of active oxygen in rats after subtotal nephrectomy*. *Nephron*, 1997. 75(1): p. 88-93.
70. Kozlov, A.B., E.A. Ostrachovitch, and I.B. Afanas'ev, *Mechanism of inhibitory effects of chelating drugs on lipid peroxidation in rat brain homogenates*. *Biochem Pharmacol*, 1994. 47(5): p. 795-9.
71. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions*. *Mayo Clin Proc*, 1988. 63(4): p. 381-9.
72. Southorn, P.A. and G. Powis, *Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease*. *Mayo Clin Proc*, 1988. 63(4): p. 390-408.
73. Pilz, J., I. Meineke, and C.H. Gleiter, *Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative*. *J. Chromatogr. B*, 2000. 742(2): p. 315-25.
74. Suttnar, J., J. Cermak, and E. Dyr, *Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis*. *Anal. Biochem.*, 1997. 249(1): p. 20-23.

75. Suttnar, J., L. Másová, and J. Dyr, *Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001. 751(1): p. 193-7.
76. Bird, R.P. and H.H. Draper, *Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination*. Methods Enzymol., 1984. 105: p. 299-305.
77. Esterbauer, H., et al., *Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes*. Biochem. J., 1982. 208: p. 129-140.
78. Ekstrom, T., et al., *Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography*. Chem. Biol Interact., 1988. 66: p. 177-187.
79. Cordis, G.A., et al., *Estimation of the extent of lipid peroxidation in the ischemic and reperfused heart by monitoring lipid metabolic products with the aid of high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr., 1993. 632: p. 97-103.
80. Buege, J.A. and S.D. Aust, *Microsomal lipid peroxidation*. Methods Enzymol, 1978. 52: p. 302-10.
81. Meerson, F.Z., et al., *[Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ischemic injury and the antioxidant protection of the heart]*. Kardiologia, 1982. 22(2): p. 81-93.
82. Halliwell, B., *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiol, 2006. 141(2): p. 312-22.
83. Sies, H. and M.E. Murphy, *Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage*. J Photochem Photobiol B, 1991. 8(2): p. 211-8.
84. Harris, E.D., *Regulation of antioxidant enzymes*. Faseb J, 1992. 6(9): p. 2675-83.
85. Mayevsky, A. and B. Chance, *Oxidation-reduction states of NADH in vivo: From animals to clinical use*. Mitochondrion, 2007. 7(5): p. 330-9.
86. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. 59(3): p. 527-605.
87. Acker, S.B.E., et al., *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*. Free Radic Biol & Medicine, 1996. 20(3): p. 331-342.
88. Saija, A., et al., *Flavonoids as antioxidants agents: importance of their interaction with biomembrances*. Free Radial Biology e Medicine, 1995. 19(4): p. 481-486.
89. West, I., *Radicals and oxidative stress in diabetes*. Diabet. Med., 2000. 17(3): p. 171-80.
90. Rellier, N. and e. al., *In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes*. Life Sci, 1999. 64(17): p. 1571-83.
91. Cameron, N.E. and M.A. Cotter, *Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Diabetes, 1997. 46(2): p. 31-37.
92. Gupta, B., M. Nehal, and N. Baquer, *Effects of experimental diabetes on the activities of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catecholamines in rat erythrocytes of different ages*. Indian J. Exp. Biol., 1997. 35: p. 792-5.
93. Dias, A.S., et al., *Alterações Gastrointestinais no Diabetes Mellitus: estresse oxidativo e fluxo sanguíneo da artéria mesentérica - estudo experimental*. Arq Gastroenterol, 2004. 41(2).

94. Ceriello, A., *New Insights on oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a "Causal" Antioxidant Therapy*. *Diabetes Care*, 2003. 26(5): p. 1589-96.
95. Rolo, A. and C.M. Palmeira, *Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006. 212: p. 167-178.
96. Oksuz, S., et al., *Biologically active compounds from the Euphorbiaceae; Part 1. Triterpenoids of Euphorbia nicaeensis subsp. glareosa*. *Planta Med*, 1993. 59(5): p. 472-3.
97. Pezzuto, J.M., et al., *DNA as an affinity probe useful in the detection and isolation of biologically active natural products*. *J Nat Prod*, 1991. 54(6): p. 1522-30.
98. Simões, J.C., et al., *Dehidrocrotonina, um norditerpeno de Croton cajucara BENTH (Euphorbiaceae)* *Ciência e Cultura*, 1979. 31: p. 1140.
99. Alviano, W.S., et al., *Antimicrobial activity of Croton cajucara BENTH linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms*. *Oral Microbiol Immunol*, 2005. 20(2): p. 101-5.
100. Hiruma-Lima, C.A., et al., *Effect of essential oil obtained from Croton cajucara BENTH. on gastric ulcer healing and protective factors of the gastric mucosa*. *Phytomedicine*, 2002. 9(6): p. 523-9.
101. Luna Costa, A.M., et al., *Antioestrogenic effect of trans-dehydrocrotonin, a nor-clerodane diterpene from Croton cajucara BENTH. in rats*. *Phytother Res*, 1999. 13(8): p. 689-91.
102. Silva, R.M., et al., *Cardiovascular effects of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from Croton cajucara in rats*. *Vascul Pharmacol*, 2005. 43(1): p. 11-8.
103. Maciel, M.A.M., et al., *Terpenoids from Croton Cajucara*. *Phytochemistry*, 1998. 49: p. 823-28.
104. Lorenzi, H. and F.J. Matos, *PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL: nativas e exóticas*. 2002, São Paulo: Pantarum. 544.
105. Miotto, A.M., *Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de Croton cajucara BENTH*. 2001, Universidade Estadual de Campinas: Campinas. p. 73.
106. Maciel, M.A., et al., *Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of Croton cajucara*. *J Ethnopharmacol*, 2000. 70(1): p. 41-55.
107. Agner, A.R., et al., *Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from Croton cajucara*. *Planta Med*, 2001. 67(9): p. 815-9.
108. Campos, A., et al., *Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from Croton cajucara leaves in mice*. *Fitoterapia*, 2002. 73(2): p. 116-120.
109. Cavalcante, F.L.M., *Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)*. 1988, Anais: Caxambu, Brasil.
110. Oliveira, M.C., et al. *Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)*. 1995. Serra Negra, Brasil.
111. Araujo, V.C., et al., *Acta Amazônica*. 1971. 1: p. 45.
112. Lopes, D., et al. in *30th International Symposium on Essential Oils*. 1999. Leipzig.

113. Farias, R.A.F., et al., *Effects of Croton cajucara Extract on serum lipids of rats fed a high fat diet*. *Phytother. Res.*, 1996. 10: p. 697-699.
114. SILVA, R.M., et al., *Blood glucose- and triglyceride- lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a diterpene from Croton cajucara BENTH in rats*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2001a. 3: p. 452 - 456.
115. Silva, R.M., et al., *Effect of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from Croton cajucara on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (tyloxapol) in mice*. *Planta Med*, 2001. 67(8): p. 763-5.
116. Silva, R.M., et al., *The lipid-lowering effect of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from Croton cajucara BENTH in mice fed on high-fat diet*. *J Pharm Pharmacol.*, 2001c. 53(4): p. 535-9.
117. Luper, S., *A review of plants used in the treatment of liver disease: part two*. *Altern Med Rev*, 1999. 4(3): p. 178-88.
118. Gordon, M.H., *Dietary antioxidants in disease prevention*. *Natural Products Report*, 1996. 4: p. 265-72.
119. Owen, R.W., B. Spiegelhalder, and H. Bartsch, *Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix*. *Gut*, 2000. 46: p. 225-232.
120. Ciola, R., *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho - HPLC*. 1998, São Paulo: Edgard Blücher.
121. Quattrocchi, O.A. and S.A. Andrizzi, *Introducción a la HPLC: Aplicación Y Práctica*. 1992, Buenos Aires: Farro.
122. Blucher, E., *Fundamentos da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho: HPLC*. 1998, São Paulo: Químico.
123. Pompeiro, A.J.L.O., *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*. 1983, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
124. St Angelo, A., *Lipid oxidation on foods*. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.*, 1996. 36(3): p. 175-224.
125. Rabello-Gay, M.A.R. Rodrigues, and R. Monteleone-Neto, *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação*. 1991, Ribeirão Preto: Soc. Bras. Genet.
126. Maris, A.F., et al., *Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in Saccharomyces cerevisiae is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria*. *Curr Genet*, 2001. 39(3): p. 137-49.
127. Tieppo, J., et al., *Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome*. *Food Chem Toxicol*, 2007. 45(7): p. 1140-6.
128. Boeira, J.M., et al., *Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 2002. 500(1-2): p. 39-48.
129. De Winde, J.H., T. J.M., and J. Winderick, *Adaptation to nutrient depletion in yeast*. In: MAGER, W.H. (ED) *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Heidelberg,, 1997: p. 7-52.
130. Gancedo, J.M., *Yeast carbon catabolite repression*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 1998. 62: p. 334-361.
131. Pringle, J.R. and L.H. Hartwell, *The Saccharomyces cerevisiae cell cycle*. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, life cycle and inheritance.*, ed. J.N. Strathern, E.W. Jones, and J.R. Broach. 1982, New York: Cold Spring Hargbor.

132. Fuge, E.K. and M. Werner, *Stationary phase in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. . *Yeast Stress Response*, 1997: p. 57-94.
133. Gralla, E.B. and D.J. Kosman, *Molecular genetics os superoxide dismutase in yeast and related fungi*. *Advances in Genetics*, 1992. 30: p. 251-319.
134. Longo, V.D., E.B. Gralla, and J.S. Valentine, *Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal Biological Chemistry*, 1999. 271(21): p. 12275-12280.
135. Izawa, S., Inque, Y. and A. Kimura, *Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Biochemical Societies.*, 1995: p. 73-76.
136. Brennan, R.J. and R.H. Schiestl, *Free radicals generated in yeast by the Salmonella test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O*. *Mutation Research*, 1998. 403: p. 65-73.
137. Lee, J.H., et al., *Protective role of superoxide dismutases against ionizing radiation in yeast*. *Biochemica et Biophysica Acta*, 2001. 1526: p. 191-198.
138. Henriques, J.A.P., et al., *Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos*. In: *Serafini, L. A., Barros, N., Azevedo, J.L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria*. 2001, Guaíba: Editora Agropecuária.
139. Maris, A.F., et al., *Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in Saccharomyces cerevisiae is not an adaptative stress response and does not depend on functional mitochondria*. *Current Genetics*, 2000. 39: p. 137-149.
140. Picada, J.N., et al., *Differential mutagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast*. *Mutation Research*, 2003. 539: p. 29-41.
141. Goldim, J.R. and M.M. Raymundo, *Pesquisa em saúde e direitos dos animais*. 2 ed. 1997, Porto Alegre: HCPA. 28.
142. Takeuchi, K., et al., *Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats*. *Digestive Diseases and Sciences*, 1994. 39: p. 626-634.
143. Owen, R.W., T. Wimonwatwatee, and B. Spiegelhalder, *A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids*. *European Journal of Cancer Prevention*, 1996. 5: p. 233-240.
144. Yost, R.W., et al., *Practical Liquid Chromatography - An Introduction*. 1980, Norwalk: Perkin Elmer.
145. Bernard, N. and A. Pecard, *A Technique de prélèvement d'chantilation de sang chez lês petits animaux de laboratoire por ponction du plexus ophthalmique*. *Journal de la Société de Biologie*, 1951. 145: p. 1465.
146. Parcker, L. and J. Fuchs, *Antioxidants in diabetes management*. 2000, New York: Ed. Marcel Dekker.
147. Bergmeyer, H., *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, 1984. 8: p. 141-8.

148. Bucolo, G. and H. DAVID, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 1973. 19: p. 476.
149. Mateos, R., et al., *Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effects of diets rich in phenolic antioxidants from fruits*. *Journal of Chromatography B*, 2005. 827: p. 76-82.
150. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the foline reagent*. *J Biol Chem*, 1951. 193: p. 265-275.
151. Guntzler, W.A. and L. Flohe, *Glutathione peroxidase*. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. 1985, Florida: CRC Press.
152. Federation, I.D., *Diabetes Atlas*. 2007, IDF.
153. McLellan, K., et al., *Custo do atendimento ambulatorial e gasto hospitalar do Diabetes Mellitus tipo 2*. *Saúde em Revista.*, 2006. 8(20): p. 37-45.
154. Diabetes, S.B.d., *Consenso Brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do Diabetes Mellitus tipo 2*. 2003, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Diabetes. 51.
155. Hernandorena, B.H.G., J.C.R.; and J.C.R. Garcia, *Animales de laboratorio en la endocrinología: biomodelos de la Diabetes mellitus tipo 1*. *Revista Cubana de Endocrinología*, 2001. 13: p. 168-177.
156. Lewis, C. and A.R. Barbiers, *Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and in vivo evaluation*. *Antibiotics annual*, 1959. 7: p. 247-254.
157. White, F.R., *Streptozotocin*. *Cancer Chemotherapy Reports*. Vol. 30. 1963. 53.
158. Carter, S.K., L. Broder, and M. Friedman, *Streptozotocin and metastatic insulinoma*. *Annals of Internal Medicine*, 1971. 74: p. 445-446.
159. Dall'ago, P., et al., *Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1997. 30: p. 119-124.
160. Leiter, E.H., *The NOD mouse: a model for insulin-dependent Diabetes Mellitus*. *Current Protocols in Immunology*, 1997. 24: p. 1-23.
161. Gitlin, N., *The liver and systemic disease*. 1997, New York: Churchill Livingstone.
162. Williamson, J., et al., *Hyperglycaemic pseudohypoxia and diabetic complications*. *Diabetes*, 1993(42): p. 801-8.
163. Aitken, R.J., *Free radicals, lipid peroxidation and sperm function*. *Reproduction, Fertility and Development*, s.L, 1995. 7: p. 659-668.
164. Allen, J.C. and R.J. Hamilton, *Rancidity in foods*. 1983, London: Applied Science. 199.
165. Therond, P., et al., *Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2000. 3: p. 373-84.
166. Larson, R.A., *The antioxidants of higher plants*. *Phytochemistry*, 1988. 27(4): p. 969-78.
167. Cotelle, A.C., *Antioxidant properties of hydroxy-flavones*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996. 21(91): p. 35-43.
168. Kalil Filho, A., G. Kalil, and A. Luz, *CONSERVAÇÃO DE GERMOPLASMA DE PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA PARA USO HUMANO*. EMBRAPA - Ministério da Agricultura e do Abastecimento do Brasil, 2000. 50: p. 1-4.

169. Araújo, V.d., et al. *Óleos Essenciais da Amazônia contendo linalol*. in **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS**. 1972. São Paulo: Academia Brasileira de Ciências.
170. Perazzo, F., et al., *Anti-inflammatory and antinociceptive activities of terpenoids from Croton cajucara BENTH*. JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS. Vol. 3. 1997, Campinas. 114-115.
171. Soares, D., A. Andreazza, and M. Salvador, *Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems*. Journal of Agric. Food Chem., 2003. 51: p. 1077-1080.
172. Kitts, D., *Bioactive substance in food: identification and potencial use*. Canadia Journal of the Physiology and Pharmacology, 1994. 72: p. 423-434.
173. Srinivasan, C., et al., *Yeast lacking superoxide dismutase(s) show elevated levels of "free iron" as measured by whole cell electron paramagnetic resonance*. J. Biol. Chem, 2000. 275: p. 29187-29192.
174. Tieppo, M., et al., *Croton cajucara BENTH*. leaf extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. Biol Pharm Bull, 2006. 29(1): p. 161-5.
175. Dorland's, *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 25 ed. 1974, Filadéfia: W. B. Saunders. 111.
176. Parcker, L. and H.J. Tritschler, *Alpha-lipoic acid - the metabolic antioxidant*. Free Radical Biology & Medicine, 1996. 20: p. 625-6.
177. McNurlan, M. and P. Garlick, *Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes*. Am J Physiol, 1981. 241: p. 238-45.
178. Rosa, F.S., *Avaliação do Estresse Oxidativo e da Atividade Genotóxica do Croton cajucara BENTH em Ratos Diabéticos*, in *PPG Diagnóstico Genético e Molecular*. 2007, Universidade Luterana do Brasil: Canoas. p. 89.
179. Sebbag, L., R. Forrat, and E. Canet, *Effect of experimental non-insulin requiring diabetes on miocardial microcirculation ischaemia in dogs*. European J Clin Invest, 1994. 24: p. 686-690.
180. Soares, J., S. Costa, and M. Cecim, *GLUCOSE AND CHOLESTEROL PLASMA LEVELS IN RATS WITH ALLOXAN-INDUCED Diabetes mellitus TREATED WITH INFUSION OF Bauhinia candicans OR Syzygium jambolanum*. Ciência Rural, 2000. 30(1): p. 113-118.
181. Waitzberg, D., *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 3 ed. 2001, São Paulo: Atheneu. 55-78.
182. Lee, W., W. Min, and S. Chun, *Low-density lipoprotein subclass and its correlating factors in diabetics*. Clin Biochem., 2003. 36(8): p. 657-61.
183. Stewart, M., et al., *Lipoprotein compositional abnormalities and insulin resistance in type II diabetic patients with mild hyperlipidemia*. Arterioscler Thromb, 1993. 13(7): p. 1046-52.
184. Nogueira Jr, F., et al., *Efeito do tamoxifeno no perfil lipídico de ratos diabéticos por estreptozotocina*. Acta Cir. Bras., 2005. 20(1): p. 69-75.
185. Gao, D., et al., *Hypoglycemic effects and mechanisms of action of Cortex Lycii Radicis on alloxan-induced diabetic mice*. Yakugaku Zasshi, 2007. 127(10): p. 1715-21.

186. Contreras, F., *et al.*, **Diabetes e Hipertensão Aspectos Clínicos y Terapêuticos**. Arch Vzlanos Farmacol Terap, 2000. 19: p. 9-24.
187. Martin, G. and J. Rand, **Current understanding of feline diabetes: part 2, treatment**. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2000. 2: p. 3-17.
188. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer, **Biochemistry**. 6 ed. 2006: WH Freeman & Co.
189. Egesie UG, *et al.*, **Safety and hypoglycaemic properties of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* in streptozotocin induced diabetic rats**. Niger J Physiol Sci., 2006. 21(1-2): p. 31-6.
190. Flegal, K., *et al.*, **Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994**. Int J Obes Relat Metab Disord. , 1998. 22: p. 39-47.
191. Salgado Jr, W., *et al.*, **Nonalcoholic fatty liver disease and obesity**. Acta Cir. Bras., 2006. 21(1): p. 72-78.
192. West, J., *et al.*, **Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus**. Quarterly journal of medicine, 2006. 99(12): p. 871-876.
193. Gonçalves Jr., F., *et al.*, **ELEVATED ALANINE AMINOTRANSFERASE (ALT) IN BLOOD DONORS: AN ASSESSMENT OF THE MAIN ASSOCIATED CONDITIONS AND ITS RELATIONSHIP TO THE DEVELOPMENT OF HEPATITIS C**. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 1998. 40(4): p. 219-224.
194. Lloris, J.M., *et al.*, **Gastric juice and analysis of basal and stimulated secretion following treatment with rice-bran oil**. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1991. 74: p. 245-248.
195. Mateos, R., L. Goya, and L. Bravo, **Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative. A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2**. Journal of Chromatography B, 2004. 805: p. 33-39.
196. Devlin, P., **Manual de bioquímica com correlações químicas**. 1999: Correlação Clínica. 447
197. Baynes, W. and S. Thorpe, **Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm**. Diabetes, 1999. 48(1): p. 1-9.
198. Yokozawa, T., K. Nakagawa, and J. Kitani, **Agric. Food Chem.**, 2002. 50: p. 35-49.
199. Frodovich, I., **oxygen toxicity: a radical explanation**. J. Exp. Biol., 1998. 201: p. 1203-09.
200. Dias, A.S., *et al.*, **Quercetin Decrease. Oxidative Stress, NF-kB activation, and iNOS overexpression in liver of Streptozotocin-induced diabetic rats**, 2005. 135: p. 2299-2304.
201. Coskum, O., *et al.*, **Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects STZ-induced oxidative stress and B-cell damage in rat pancreas**. Pharmacol Res., 2005. 51: p. 117-23.
202. Ozkaya, Y., *et al.*, **The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats**. Diabetes Metab., 2002. 28: p. 344-84.
203. Yilmaz, H., *et al.*, **Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver**. Biochem. Mol. Toxol, 2004. 18: p. 234-8.

204. Aliciguzel, Y., *et al.*, *Activities of xantine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats*. J. Lab. Clin. Med., 2003. 142: p. 172-7.
205. Essani, N., G. McGuire, and A. Manning, *Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kB in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo*. J. Immunol., 1996. 156: p. 2956-63.
206. McCord, G., A. Michelson, and F. I., *Superoxide and Superoxide dismutase* 1977, New york: Academic.

ANEXOS

