



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

LEONARD DOMINGO ROSALES ACHO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DE
EXTRATOS DAS CASCAS DE *Salacia impressifolia*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

MANAUS

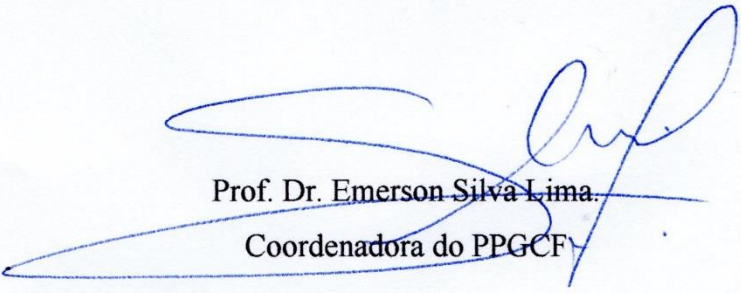
2018

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDIABÉTICA DE EXTRATOS DAS CASCAS DE

Salacia impressifolia

LEONARD DOMINGO ROSALES ACHO

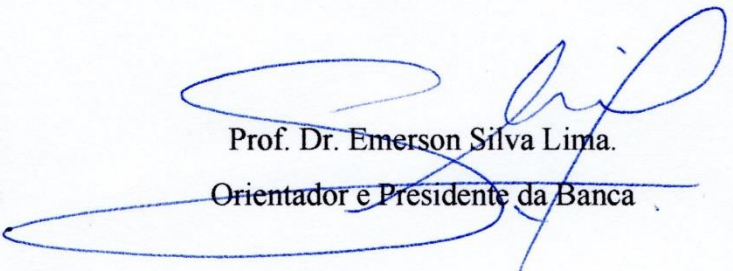
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM, 05/04/2018.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

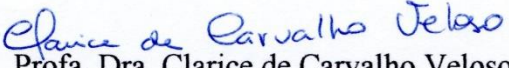
Coordenadora do PPGCF

A apresentada perante a banca composta pelos professores:

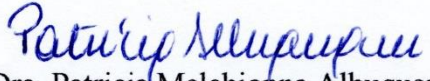


Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

Orientador e Presidente da Banca


Profa. Dra. Clarice de Carvalho Veloso

Membro interno (UFAM)


Profa. Dra. Patricia Melchionna Albuquerque

Membro Externo (UEA)

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Acho, Leonard Domingo Rosales
A179a Avaliação da atividade antidiabética de extratos das cascas de
Salacia impressifolia. / Leonard Domingo Rosales Acho. 2018
78 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima
Coorientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Diabetes. 2. Glicação. 3. Hemoglobina glicada. 4.
Carboximetilisina. 5. AGEs. I. Lima, Emerson Silva II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a gradeço a Deus por ser o autor do meu destino.

A meus pais por serem a peça chave na engrenagem da minha vida, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida e se sou, o que sou e serei é graças a eles.

À minha esposa que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem nas dificuldades e ao meu filho que ilumina de maneira especial meu coração e meus pensamentos.

Meu amigo Carlos, pois quando preciso de um ombro amigo sempre posso contar com ele e que nossa amizade continue por mais décadas.

A meu orientador pela paciência e pela grande chance de me deixar entrar neste mundo da pesquisa.

Ao Dr. Hector Ferreira Koolen professor da UEA pela parceria e amizade na pesquisa.

À equipe do Laboratório de espectroscopia de Massas da Universidade Federal do Amazonas.

A os professores que com seus conhecimentos e colaboração fizeram realidade este trabalho.

Aos colegas de trabalho do BIOPHAR e FITOPHAR, em especial Carol Valentin, Leilane, Angela Comapa, Marcia de Jesus, Talita Machado, Barbara Janaína, Isabella, Rennan, Lorena e Rodrigo.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio com a bolsa.

*Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível.*

São Francisco de Assis

RESUMO

Tendo em consideração o impacto causado pelas alterações metabólicas, como o diabetes, na sociedade, na economia e no estilo de vida, é de relevante importância a procura de novas alternativas terapêuticas oriundas de produtos naturais. Com isso, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antidiabética de extratos das cascas de *Salacia impressifolia* conhecida popularmente como “cipó miraruira” em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, quatro extratos foram obtidos por maceração sequencial em solventes de diferentes polaridades. Os extratos obtidos: Hexânico (EHSI), acetato de etila (EASI), metanólico (EMSI) e hidroetanólico (EhSI); foram avaliados *in vitro* quanto ao teor de fenóis e flavonoides, atividade antioxidante, efeito antiglicante e possíveis efeitos sobre a inibição de enzimas envolvidas no processo de absorção de carboidratos e lipídeos. O EHSI foi caracterizado quimicamente por RMN e foi avaliado quanto a sua citotoxicidade e efeito antidiabético *in vivo*. Foram realizados os ensaios experimentais *in vivo* com Camundongos Balb/c, machos, para o ensaio agudo do teste de tolerância oral à glicose foram utilizados camundongos não diabéticos e para o ensaio crônico foi realizada a indução do diabetes através de uma dieta hiperlipídica e injeção intraperitoneal de estreptozotocina (35 mg/kg) por 7 dias. Os camundongos com glicemia maior que 250 mg/dL foram considerados diabéticos, sendo monitorados por 25 dias. As amostras de sangue para a dosagem no soro de marcadores bioquímicos foram coletadas por punção cardíaca no último dia do experimento antes do sacrifício. A caracterização química do extrato hexânico por RMN evidenciou a presença de priestimerina, tingenona, α e β amirina como compostos majoritários. O EhSI teve em sua composição maior teor de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante ao serem comparados ao EHSI. Nenhum dos 4 extratos inibiu significativamente a enzima α -glucosidase. Entretanto, o EHSI apresentou significativa atividade contra a enzima lipase com CI_{50} de $13,03 \pm 0,7$ μ g/mL e também inibiu a glicação por via oxidativa e não oxidativa com CI_{50} de $19,6 \pm 0,5$ e $28,7 \pm 1$ μ g/mL. No teste de viabilidade celular o EHSI obteve CI_{50} de $12,26 \mu$ g/mL a 72 horas após o tratamento e no teste de toxicidade aguda *in vivo* não foi capaz de promover óbito nos animais na concentração única de 2000 mg/kg. Nos ensaios *in vivo* de avaliação do efeito agudo, o extrato hexânico na concentração de 100 e 50 mg/kg estimulou a captação de glicose e também diminuiu a glicemia de animais diabéticos quando tratados com as mesmas concentrações por 25 dias. Nas análises bioquímicas, o EHSI promoveu a diminuição da glicose, insulina, TGO, triglicerídeos e um aumento da creatinina ao serem comparados com os camundongos diabéticos não tratados. Em conclusão, o extrato hexânico das cascas de *S. impressifolia* apresenta um ótimo potencial antiglicante *in vitro* e hipoglicemiante *in vivo*, que corrobora o uso popular da espécie. Os dados obtidos foram importantes para a caracterização biológica desta planta e sua aplicação como um possível fitoterápico para o tratamento do diabetes.

Palavras-chave: Diabetes; Glicação, Hemoglobina glicada, Caboximetilisina, AGEs.

ABSTRACT

Considering the impact caused by metabolic changes such as diabetes in society, in the economy and in the lifestyle, it is of relevant importance the search for new therapeutic alternatives as natural products derived from plants. Therefore, this study aimed to evaluate the antidiabetic activity of *Salacia impressifolia* hexanic extract (EHSI) in experimental models *in vitro* and *in vivo*. Firstly, four extracts were obtained by sequential maceration from the most apolar solvent to the most polar. The chemical characterization of the EHSI by NMR evidenced the presence of priestimerin, tingenone, and α - and β -amirine as major compounds. The extracts obtained in sequential maceration (hexanic, ethyl acetate, methanolic, and hydroethanolic) were evaluated *in vitro* in order to quantificate the content of phenols, flavonoids, antioxidant activity, anti-glycating effect, and possible effects on the inhibition of enzymes involved in the process of absorption of carbohydrates and lipids. Cytotoxic assays and analyses of *in vivo* antidiabetic effect were carried out with the EHSI. The experiments were performed *in vivo* with male Balb/c mice. For the acute oral glucose tolerance test it was used non-diabetic mice and for the chronic diabetes assay it was performed diabetes induction through a high fat diet and an intraperitoneal injection of streptozotocin (35mg/kg) for 7 days. Mice with glycemia up to 250 mg/dL were considered diabetic and monitored for 25 days. Blood samples were collected by cardiac puncture on the last day of the experiment before sacrifice in order to dose biochemical markers. The hydroethanolic extract showed the highest content of phenolic compounds and higher antioxidant activity when compared to the hexanic extract. None of the four extracts significantly inhibited α -glucosidase enzyme. However, the HESI showed significant activity against lipase enzyme with IC_{50} of $13.03 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ and also inhibited glycation by oxidative and non-oxidative routes with IC_{50} of 19.6 ± 0.5 and $28.7 \pm \mu\text{g/mL}$. In the cell viability test the HESI obtained an IC_{50} of $12.26 \mu\text{g/mL}$ in the first 72 hours and in the acute toxicity test *in vivo* it was not able to promote death at the single concentration of 2000 mg/kg. In the *in vivo* acute effect evaluation assays, the HESI increased glucose uptake at 100 and 50 mg/kg and also decreased glycemia in diabetic animals when treated at the same concentrations for 25 days. In the biochemical analyzes, the HESI promoted a decrease in glucose, insulin, glutamic oxaloacetic transaminase (SGO-T), triglycerides and increased release of creatinine. In conclusion, the hexanic extract tested in the present study presents a great antiglycant potential *in vitro* and hypoglycemic *in vivo*, which corroborates the popular use in Amazonian folk medicine. The data obtained were important for the biological characterization of this extract and the possible application as herbal medicine for the treatment of diabetes.

Key words: diabetes, glycation, glycated hemoglobin, carboxymethyllysine, AGEs..

Lista de Siglas e Abreviaturas

ABTS	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid.
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferasa
BSA	Albumina de Soro Bovino
C/EBP α	Proteína de Ligação ao Intensificador de CCAAT.
CML	N - Carboximetil lisina
DAMPS	Molécula Padrão Associada a Dano Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo
FAL	Fosfatase Alcalina
GGT	Gama Glutamil Transpeptidase
Glo-1	Glioxalase 1.
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GPDH	Glicerol-3-fosfato Desidrogenase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL-c	Colesterol - Lipoproteína de Alta Densidade
HLA-DR3	Antígenos de Histocompatibilidade DR3
HLADR4	Antígenos de Histocompatibilidade DR4
HMGB1	Proteína do grupo 1 de mobilidade alta
HSA	Albumina Humana Sérica
IL-1 β	Interleukin 1 β
KK-Ay	Camundongos Diabéticos Geneticamente Modificados.
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LDL-c	Colesterol - Lipoproteína de Baixa Densidade
LOX	Lipoxigenase
LPL	Lípase lipoproteica
LPS	Lipopolissacarídeo
MRPs	Produtos Iniciais da Reação de Maillard
NADPH+H ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NF-kB	Factor Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR- γ	Receptor- γ ativado por proliferador de peroxissoma.
RAGE	Receptor Específico de AGE
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
S100A8/A9	Calprotectina.
S100B	Calgranulina B
SNC	Sistema Nervoso Central

TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

Lista de Tabelas

Tabela 01: Rendimento dos extratos obtidos em solventes de diferentes polaridades em 100g da casa de *S. impressifolia*.....48

Tabela 02: Quantificação do total de fenóis e Flavonoides dos extratos de *S. impressifolia*. Os resultados são expressos em porcentual (%), em mg eq Ac Gálico/g a e mg eq Quercetina/g. Cada dado representa à média e o desvio padrão (DP) dos extratos em triplicata.....52

Tabela 03: Os resultados bioquímicos dos grupos Normoglicêmicos (NG), Metformina 300 mg/kg (METF300), Salacia 100mg/kg (EHSI100) e Salacia 50mg/kg (EHSI50) são expressos em média $\pm$ DP (N=6/Grupo) e analisados por One-way ANOVA seguido por Dunnett, onde $p < 0,0001$ (a), $p < 0,001$ (b), $p < 0,01$ (c) e $p < 0,05$ (d), mostrando uma diferencia estatística significativa ao serem comparados com o grupo Controle (CTL).....62

Lista de Figuras

Figura 01: Hiperglicemia em órgãos não dependentes de insulina.....	20
Figura 02: Rotas de formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)	22
Figura 03: Ativação dos Receptores AGEs (RAGEs) por Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)	23
Figura 04: Estrutura química do salicinol e mangiferina.....	27
Figura 05: <i>Salacia impressifolia</i>	32
Figura 06: Triterpenos isolados de extratos Clorofórmio, Metanol, Hexano e Acetato de etila das cascas do caule de <i>Salacia impressifolia</i>	33
Figura 07: RMN de ¹ H geral do extrato em Hexano após procedimento em SPE.....	50
Figura 08: RMN de ¹³ C geral do extrato em Hexano após procedimento em SPE.....	50
Figura 09: Dilucidação estrutural da tingenona e 22-hidroxi-tingenona (A). Dilucidação estrutural da priestimerina e 30-hidroxi-priestimerina (B).....	51
Figura 10: Atividade inibitória (%) dos extratos de <i>S. impressifolia</i> : Hidroetanólico (EhSI), Metanólico (EMSI), Acetato de etila (EASI) e Hexânico (EHSI) sobre os radicais DPPH* (A) e ABTS* (B) em diferentes concentrações. Atividade antioxidante expressado em CI50 dos extratos (EhSI, EMSI, EASI e EHSI) frente aos radicais DPPH (C) e ABTS (D) onde o padrão usado como controle positivo foi o ácido gálico (AG). As letras diferentes indicam uma diferencia estatística significativa pelo teste One-way ANOVA de comparação múltipla de Tukey, <i>p</i> <0,05.....	53
Figura 11: Atividade inibitória (%) dos extratos de <i>S. impressifolia</i> : Hidroetanólico (EhSI), Metanólico (EMSI), Acetato de etila (EASI) e Hexânico (EHSI) sobre a enzima α -glucosidase na concentração de 100 μ g/mL (A), Atividade inibitória (%) dos extratos em diferentes concentrações sobre a enzima Lipase (B), Atividade inibitória da lipase do EASI e EHSI expressados em CI50 (C). Os padrões utilizados para comparar os extratos foram: Acarbose (ACB) para inibição da enzima α -glucosidase e Orlistat (ORL) para a inibição da enzima lipase. As letras diferentes indicam uma diferencia estatística significativa pelo teste One-way ANOVA de comparação múltipla de Tukey, <i>p</i> <0,05.....	54

Figura 12: Atividade inibitória (%) dos extratos de *S. impressifolia*: Hidroetanólico (EhSI), Metanólico (EMSI), Acetato de etila (EASI) e Hexânico (EHSI) sobre a glicação por via oxidativa (A) e a CI50 dos extratos por esta via (B). Atividade inibitória (%) dos extratos de *S. impressifolia* sobre a glicação por via não oxidativa (C) e a CI50 dos extratos por esta via (D). Os padrões usados são a Quercetina (Q) para a inibição da glicação por via oxidativa e Aminoguanidina (Ag) para a via não oxidativa. As letras diferentes indicam uma diferença estatística significativa pelo teste One-way ANOVA de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$56

Figura 13: A viabilidade celular foi testada em diferentes concentrações do extrato hexânico (EHSI) durante 24 e 72 horas em a linhagem celular MRC-5 mediante o método de Alamar Blue e os resultados foram expressos em Média $\pm$ SEM e triplicata do porcentual de células viáveis. One-way ANOVA com o teste Dunnett foi aplicado. Onde: $p < 0,0001$ (a) é significativa, quando comparado ao controle (CTL).....57

Figura 14: Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em camundongos normais. Os grupos controle (CTL), hexânico 100 mg/kg (EHSI100), hexânico 50 mg/kg (EHSI50) e metformina 300 mg/kg (METF300) foram tratados com uma sobrecarga de glicose por via oral e a glicemia plasmática foi mesurado em um período de tempo em minutos. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM para ($n = 6$). Two way ANOVA com teste Dunnett foi aplicado. Onde: $p < 0,0001$ (a), $p < 0,001$ (b), $p < 0,01$ (c), $p < 0,05$ (d) mostra diferença estatística significativa, quando comparado ao Grupo Controle (CTL).....59

Figura 15: No teste crônico (B), vemos o efeito da administração do EHSI na glicemia dos camundongos diabéticos em um período de tempo em dias. O diabetes foi induzido por dieta hipercalórica e por aplicação de estreptozotocina por 7 dias, os camundongos com glicemia superior a 250 mg/dL foram separados e em grupos: Normoglicêmicos (NG), controle (CTL), metformina (METF300) e os grupos testes (EHSI50 e EHSI100). Os grupos NG e CTL foram tratados com 200 μ L de veículo (Soro fisiológico + Kolliphor 3%) Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM para ($n = 5$). Two way ANOVA com teste Dunnett foi aplicado. Onde: $p < 0,0001$ (a), $p < 0,001$ (b), $p < 0,01$ (c), $p < 0,05$ (d) mostra diferença estatística significativa, quando comparado ao Grupo Controle (CTL).....60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Diabetes	18
2.1.1 Fisiopatologia	18
2.2 Produto Final da glicação Avançada (AGE)	21
2.2.1 Mecanismo de formação.....	21
2.2.2 Mecanismos de ação tóxica	22
2.3 Espécies com atividade antiglicante e antidiabética	26
2.4 Gênero <i>Salacia</i>. <i>Ssp.</i>	27
2.4.1 <i>Salacia oblonga</i>	28
2.4.2 <i>Salacia chinensis</i>	29
2.4.3 <i>Salacia reticulata</i>	30
2.4.4 <i>Salacia impressifolia</i>	31
3. OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Fluxograma Experimental.....	36
4.2 Matéria-prima	37
4.3. Obtenção do Extrato	37
4.4 Caraterização Química.....	37
4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	38
4.5.1 Teor de fenólicos totais	38
4.5.2 Teor de Flavonóides Totais	38
4.5.3 Atividade sequestrante do Radical DPPH'	39
4.5.4 Atividade sequestrante do radical ABTS*	40
4.5.5 Atividade inibidora α -glucosidase de Murino	40
4.5.6 Atividade inibitória da lipase.....	41
4.5.7 Atividade antiglicante: Via Oxidativa	42
4.5.8 Atividade antiglicante: Via não oxidativa	42
4.5.9 Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular	43
4.6 Modelos experimentais <i>in vivo</i>.....	43
4.6.1 Análises de Toxicidade Aguda	44
4.6.2 Teste de tolerância oral à Glicose – TTOG.....	44
4.6.3 Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônico DM2.....	45
4.7 Aspectos Éticos: CEUA	47
4.8 Análise estatística.....	47
5. RESULTADOS	48
5.1 Rendimentos dos extratos.....	48
5.2 Caraterização Química.....	49

5.3 Testes <i>in vitro</i>	52
5.3.1 Teor de Fenóis e flavonoides	52
5.3.2 Atividade antioxidante sobre os radicais DPPH* e ABTS* <i>in vitro</i>	52
5.3.3 Atividades inibitórias das enzimas digestivas α -glucosidase e lipase <i>in vitro</i>	53
5.3.4 Atividade antiglicante por via oxidativa e não oxidativa <i>in vitro</i>	55
5.4 Ensaio Celular <i>in vitro</i>	57
5.4.1 Viabilidade celular	57
5.5 Testes <i>in vivo</i>	58
5.5.1 Análise da Toxidade	58
5.5.2 Efeitos do extrato hexânico no teste oral de tolerância a Glicose (TOTG)	58
5.5.3 Efeito do extrato hexânico de <i>S. impressifolia</i> em camundongos diabéticos	60
5.5.4 Dosagens bioquímicas	62
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO:	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

Diante de um mundo altamente industrializado que traz consigo o aumento do sedentarismo e a ingestão de produtos industrializados, vai-se montando um novo palco que predispõe com maior frequência ao aparecimento de doenças metabólicas. Um claro exemplo deste caso, é o diabetes, que faz parte da síndrome metabólica ocasionando sérios problemas socioeconômicos de grandes magnitudes vinculados à saúde pública. Também gera um custo aproximado de \$825 bilhões por ano, sendo que 9% da população mundial têm diabetes e a cada 6 horas ocorre uma morte devido às suas complicações. (NCD-RISC, 2016).

Em geral, o diabetes cresce exponencialmente e o tipo 2 é a mais comum em adultos (80-97%). Em razão do metabolismo próprio do diabetes, esta acomete principalmente o fígado, rins, cérebro causando complicações tais como nefropatias, hepatopatias e neuropatias diabéticas. As complicações do diabetes encontram-se diretamente ligadas a uma hiperglicemia constante que traz como consequência a formação de “Produtos Finais da Glicação Avançada” ou AGEs, que são gerados por um processo não enzimático chamado de glicação, tal processo acontece por 2 vias a oxidativa e a não oxidativa (DAGOGO-JACK, 2016; JURANEK et al., 2015).

Na via não oxidativa da glicação, a condensação do grupamento amina de uma proteína e um grupamento carbonila de um açúcar redutor ou aldeído reativo formam a “Base de Schiff”, este produto instável sofre uma série de rearranjos até a formação de uma estrutura mais estável conhecida como “Produtos de Amadori” que por enolização, condensam os resíduos de lisina, cisteína e arginina até a formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Na via oxidativa da glicação, são formados compostos dicarbonilas altamente reativos pela oxidação

de carboidratos, lipídeos e proteínas ou da glicólise que interagem com os agrupamentos amina das proteínas formando os AGEs (HARTOG et al., 2007; VISTOLI et al., 2013).

Os AGEs geram danos por três principais mecanismos: alterando estruturas dentro da própria célula, alterando estruturas extracelulares (sinalização entre as moléculas da matriz extracelular e a célula) e ligando-se a receptores específicos como os RAGEs desencadeando uma resposta inflamatória (BIERHAUS et al., 1998; KIERDORF E FRITZ, 2013; THORNALLEY, 2003).

Estudos mostram que o diabetes eleva às anormalidades estruturais, biomoleculares e metabólicas no cérebro provocadas pela alta concentração de AGEs no hipotálamo e, por essa razão, representa um fator de risco para as doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (ARNOLD et al., 2014; BUTTERFIELD et al., 2014; DUARTE et al., 2013).

Várias pesquisas realizadas com extratos naturais da China como a *Salacia chinensis* e da Ásia como a *Salacia reticulata* e *Salacia oblonga*, mostraram que o gênero *Salacia* possui uma atividade moduladora de lipídeos, glicose e da glicação. Essas atividades estão diretamente vinculadas às funções hipoglicemiantes, antiglicantes e citoprotetoras das células hepáticas, pancreáticas, renais, cardíacas e neuronais (BASU et al., 2016; BHAT et al., 2012; 2016; MORIKAWA et al., 2015; SALAHUDDIN et al., 2014; SHIRAKAWA et al., 2016; SINGH et al., 2015).

Na Amazônia encontra-se apenas um representante deste gênero, que segundo a medicina tradicional é usada para o tratamento do diabetes, obesidade, artrites, infecções microbianas e até mesmo o câncer; tal espécie é a *Salacia impressifolia* ou mais conhecida como cipó miraruíra. Essa planta, possui potencial chance de possuir as mesmas propriedades da *S. chinensis*, *S. reticulata* e *S. oblonga* por pertencer ao mesmo gênero e pelos relatos

empíricos do povo amazonense. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo investigar a *S. impressifolia*, uma planta nativa do Brasil, quanto às suas atividades antiglicante e para o tratamento do diabetes (SHIRAKAWA et al., 2016; SINGH et al., 2015).

Em função da pressão social e de um mercado altamente competitivo e sedento por opções terapêuticas mais eficazes e viáveis para tratar doenças metabólicas crônicas, como é o caso do diabetes e suas complicações, o presente trabalho buscou atender tais expectativas usando recursos naturais da região amazônica para poder estudar o cipó-miraruira, uma planta amplamente conhecida pela medicina folclórica amazonense para o tratamento da diabetes e gerar um possível medicamento fitoterápico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes

O diabetes, obesidade e hipertensão formam a síndrome metabólica, caracterizada pela hiperglicemia crônica, sendo causada pela diminuição ou ausência da secreção do hormônio insulina que com o tempo causa distúrbios metabólicos dos carboidratos, lipídeos e proteínas levando a complicações como: retinopatia, nefropatia, neuropatia, hepatopatia, doença aterosclerótica, infecções constantes entre outras (MOTTA, 2011).

2.1.1 Fisiopatologia

Todos os efeitos metabólicos que levam ao desenvolvimento do quadro clínico característico do diabetes são causados porque a célula não consegue metabolizar a glicose que se encontra no meio extracelular, obrigando-a a procurar fontes energéticas internas para obter e liberar glicose (McKEE, 2003).

A diminuição da captação de glicose aumenta sua produção endógena por: glicogenólise, que hidrolisa o glicogênio do fígado; lipólise, que libera glicerol e ácidos graxos do tecido adiposo; e proteólise, que libera aminoácidos do tecido muscular com a finalidade de aumentar os níveis de glicose em sangue. Este estado de hiperglicemia leva à diurese osmótica porque a glicose é osmoticamente ativa que resulta em: glicosúria, desidratação, polidipsia, poliúria, polifagia e dano renal (BAYNES, 2011).

O diabetes pode apresentar um estado hiperosmolar: cetônico ou não cetônico. No estado hiperosmolar cetônico, os ácidos graxos livres resultantes da hidrólise dos

triacilgliceróis são depositados nos vasos sanguíneos produzindo aterosclerose, e os ácidos graxos livres restantes passam pelo processo de β -oxidação nas mitocôndrias do fígado para gerar Acetil-coA. Este Acetil-coA é usado para fabricar corpos cetônicos como o ácido acetoacetato, acetona e ácido β -hidroxibutírico, que servem como fonte de energia e são liberados no plasma causando cetonemia. O aumento desses corpos cetônicos de natureza ácida diminui o pH sanguíneo e produz a acidose metabólica diabética. O glicerol proveniente do triacilglicerol é usado na gliconeogênese pelo fígado e os ácidos graxos livres que não sofrem β -oxidação são usados para sintetizar VLDL provocando hiperlipoproteinemia (McKEE, 2003).

O estado hiperosmolar não cetônico se diferencia pela presença de insulina, que inibe a produção do glucagon e estimula a lipase lipoproteica (LPL) que hidrolisa os triglicerídeos sanguíneos para obter ácidos graxos do VLDL e quilomicra, os quais são armazenados nos adipócitos, afetando negativamente a lipólise e a oxidação de ácidos graxos, porém com ausência de cetonas. O risco de desenvolver esta forma de diabetes aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física (BISHOP, 2007).

Existem células que não precisam da insulina por serem praticamente permeáveis à glicose, tais como as células do cristalino, retina, rins, eritrócitos, placenta, ovários, SNC e células de Schwann dos nervos periféricos. Estas células possuem em seu interior a enzima aldose redutase, que utiliza $\text{NADPH} + \text{H}^+$ como cofator para produzir sorbitol. O sorbitol não é metabolizado à frutose pela sorbitol desidrogenase, por ausência desta enzima nas células antes listadas, acumulando-se no interior da célula pela sua dificuldade em atravessar a membrana plasmática. O grande acúmulo de sorbitol causado pelo aumento da glicose plasmática no diabético produz um forte efeito osmótico causando tumefação e inchaço celular, como mostra a Figura 01 (CHAMPE, 2006).

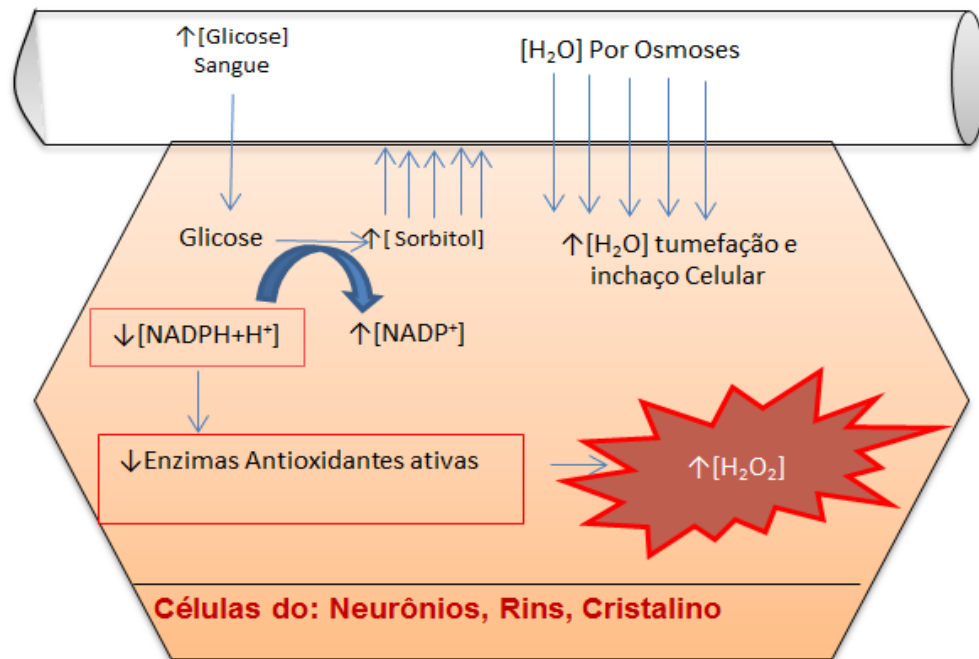


Figura 01: Como atua a hiperglicemia em órgãos não dependentes de insulina. Fonte: Adaptado de Champe., P. C. 2006.

As enzimas antioxidantes glutathione reductase, catalase e óxido nítrico sintetase são afetadas por precisarem do $\text{NADPH}+\text{H}^+$ como cofator, criando um ambiente altamente oxidativo com aumento de peróxido de hidrogênio (CRUZ, 2011; DÍAZ, 2006).

2.2 Produto Final da glicação Avançada (AGE)

Um ambiente altamente hiperglicêmico, causado pelas altas concentrações de glicose no sangue, é propício para um fenômeno não enzimático chamado de glicação, que promove a formação de Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) que segundo pesquisas, seu acúmulo em grandes quantidades está diretamente ligado à várias doenças crônicas como cegueira, insuficiência renal, neuropatias e doenças cardiovasculares (BIERHAUS, 1998; THORNALLEY, 2003).

2.2.1 Mecanismo de formação

A principal via de formação dos AGEs é a não oxidativa, tal processo acontece pela condensação entre um grupamento carbonila de um açúcar redutor ou aldeído reativo e um grupamento amina proveniente de aminoácidos, proteínas ou ácidos nucleicos que formam a “Base de Schiff”. Este produto instável sofre uma série de rearranjos até a formação de uma estrutura mais estável conhecida como “Produto de Amadori”, também conhecido como produto inicial da reação de Maillard (MRPs), que contém grupos carbonilas reativos, por enolização condensam os agrupamentos aminas dos resíduos de lisina, cisteína e arginina até a formação de produtos fluorescentes conhecidos como AGEs, tal como é mostrado na figura 02 (HARTOG, 2007; VISTOLI, 2013).

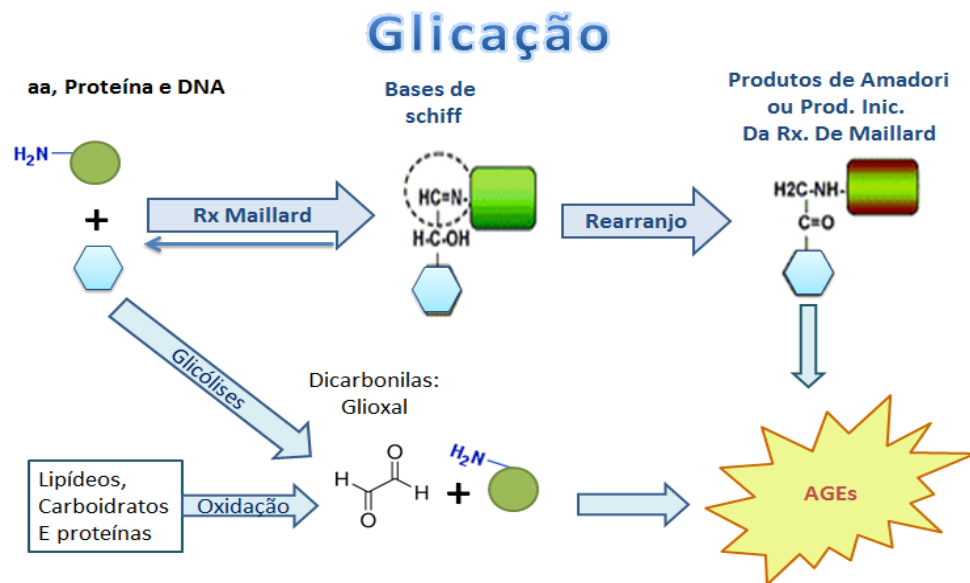


Figura 02: Rotas de formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Fonte: Adaptado de Vistoli et al., 2013

Existem outros mecanismos alternativos para a formação de AGEs por via oxidativa, tais como: a própria oxidação da glicose (autooxidação e glicólise), oxidação de lipídeos (lipoxidação) e carboidratos (glicoxidação) formando compostos dicarbonílicos como o metilglioxal e glioxal que são 20 vezes mais reativos que a glicose (GILLERY, 2001; HUEBSCHMANN, 2006).

2.2.2 Mecanismos de ação tóxica

Os AGEs geram danos por três principais mecanismos: alterando estruturas intracelulares e extracelulares (sinalização entre as moléculas da matriz extracelular e a célula) e ligando-se a receptores específicos (RAGE) que desencadeiam uma resposta inflamatória (KIERDORF, 2013; THORNALLEY, 2003).

Os RAGEs estimulam uma resposta inflamatória e encontram-se na membrana externa das células endoteliais, células lisas do músculo, neurônios, micróglia, monócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas e células T. Também pertencem à um grupo heterogêneo de receptores que podem ser ativados por diferentes ligantes, tais com: AGEs, A β , HMGB1 e as DAMPS, tais como S100A8/A9 e S100B (KIERDORF, 2013).

Ao se ligarem aos seus receptores, os AGEs estimulam a via do NF- κ B, que migra até o núcleo e ativa os genes de vários produtos pró inflamatórios que sinalizam a migração celular ao foco, como ilustrado na Figura 3. Além disso, estimulam a expressão de mais RAGE que sensibilizarão ainda mais a célula. (MESQUITA, 2014).

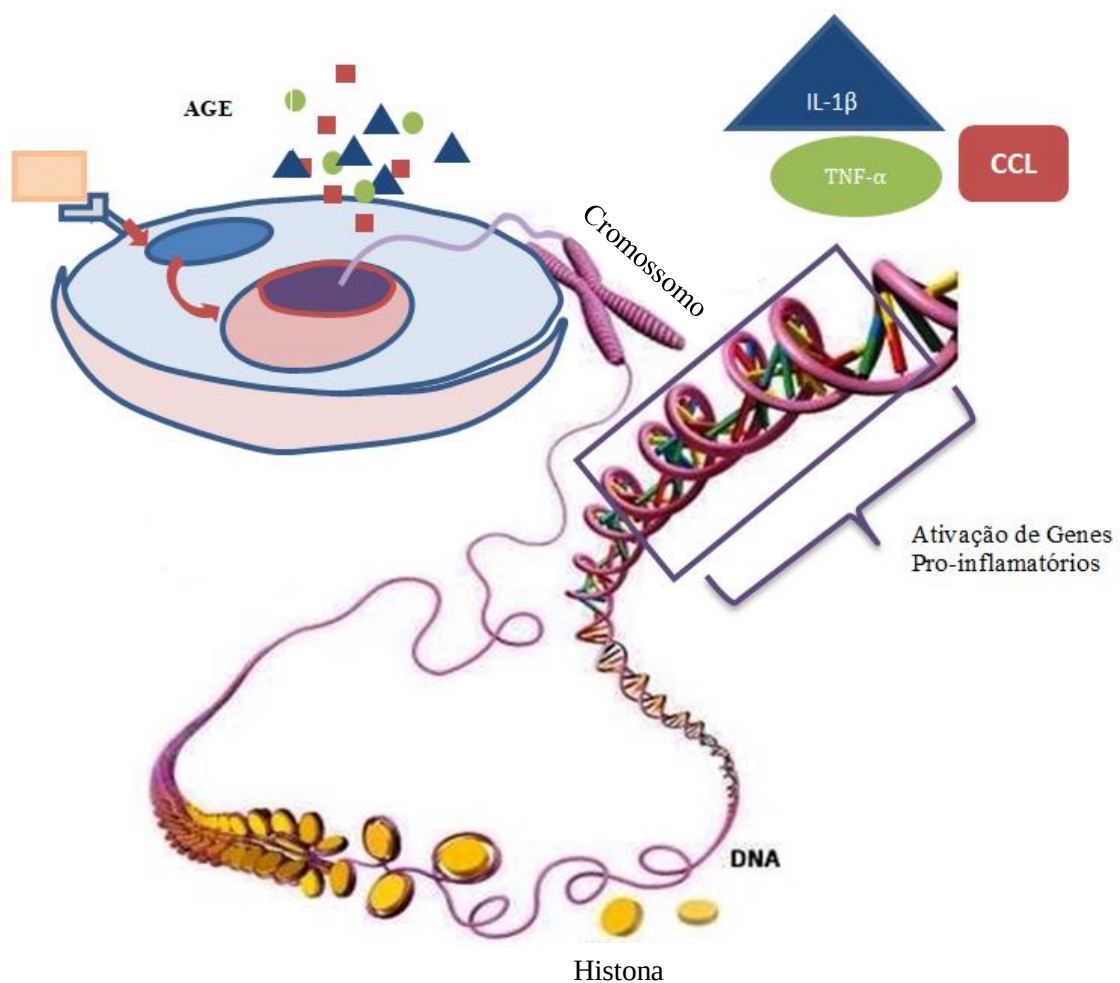


Figura 03 - Ativação dos Receptores AGEs (RAGEs) por Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). Fonte: Adaptado de Mesquita, 2014.

No começo os neutrófilos sofrem uma hiperativação pela grande quantidade de AGEs produzidos em função da prolongada hiperglicemia que aumenta o *pool* de Ca_2^+ intracelular e exacerba a capacidade fagocitária. Entretanto, esse efeito leva a causar esgotamento dos neutrófilos e leva a diminuir sua eficácia contra bactérias, ocasionando uma susceptibilidade às infecções e levando à um estado de inflamação crônica comum no diabetes. Em monócitos e macrófagos, os AGEs são essenciais para a ativação e diferenciação dos mesmos, promovendo a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, e CCL_2). Nas células endoteliais humanas, os RAGES ativados ajudam na migração dos leucócitos por uma reorganização dos filamentos de actina que aumenta a permeabilização. Porém, mesmo com a diminuição dos AGEs endógenos, os RAGES podem ser ativados por outros ligantes gerando um dano tecidual crônico (KIERDORF, 2013).

Uma estrutura tridimensional correta é exigência obrigatória para as proteínas funcionarem corretamente e os AGEs podem alterar as estruturas primárias, secundárias e terciárias das proteínas que se encontram dentro ou fora da célula, como, por exemplo, do colágeno, uma proteína encontrada em grande quantidade no organismo sendo importante nas funções biológicas. A glicação do colágeno traz mudanças complexas tanto pelo dano da estrutura primária como pela agregação de proteínas (ASHRAF, 2015; CAMPBELL, 2016).

A albumina humana sérica (HSA) é rica em resíduos de lisina e estudos mostram aspectos autoimunes contra resíduos de lisina glicada no soro em pacientes com DM1 e DM2, consiste em um novo cenário onde a HSA influenciada sobre um estado de hiperglicemia persistente forma a Albumina de Amadori que sofre alterações na sua estrutura secundária e terciária em presença da glicose. Esta modificação expressa epítomos fazendo com que o sistema imunológico o reconheça como “não próprio” estimulando à produção de anticorpos (NEELOFAR, 2016).

Campbell e colaboradores (2016) relatam que ratos saudáveis reduzem a resistência mecânica do tecido ósseo quando diabéticos, possivelmente causado pela glicação do colágeno. O tratamento com insulina por 12 semanas foi capaz de diminuir a concentração de glicose e a HbA1c no soro, contudo, não diminuiu significativamente a concentração dos AGEs e não melhorou a resistência mecânica óssea. Este resultado mostra que o período de tratamento para diminuir a glicação do colágeno no tecido ósseo deve ser um tratamento prolongado superior a 12 semanas (CAMPBELL, 2016).

A produção de AGEs é maior em um estado crônico, como o diabetes, onde a concentração de glicose no sangue encontra-se aumentada. Os AGEs são disseminados por todo o corpo pelo fluido sanguíneo alterando as funções de vários órgãos e até mesmo do DNA. Um estudo realizado no Hospital İstanbul Zeynep Kamil na Turquia nos anos de 2013-2014 mostrou que a HbA1c, um marcador que acompanha o estado glicêmico em até 2 meses retroativos, e o estresse oxidativo tem uma correlação positiva com o dano genômico mostrado nos ensaios de cometa e micronúcleo realizados em 52 pacientes com síndrome metabólica quando foram comparados com 35 pacientes controles saudáveis (KARAMAN, 2015; SZEREMETA, 2009).

Shirakawa e colaboradores (2016) quantificaram o teor de CML por LC-MS/MS em diferentes órgãos como: a orelha, tendão de Aquiles, músculo Gastrocnêmio, cristalino dos olhos, soro e medula óssea do fêmur. Logo após 12 semanas de indução do diabetes tipo 1 com estreptozotocina em ratos, o CML encontra-se visivelmente mais elevado na medula óssea em comparação como os outros órgãos. Isto pode servir como um marcador da concentração de AGEs em ratos diabéticos (SHIRAKAWA, 2016).

2.3 Espécies com atividade antiglicante e antidiabética

A Amazônia possui uma grande diversidade de plantas que podem apresentar uma solução fitoterápica para o tratamento do diabetes tipo 2. Shakthi e colaboradores (2014) testaram 6 sementes de frutos tropicais conhecidos por suas vastas propriedades medicinais. Com a finalidade de comprovar a atividade antiglicante, foram obtidos os extratos por maceração em água quente a 90 °C por 5 minutos e por diferentes solventes orgânicos como clorofórmio, acetona, acetato de etila, etanol e água destilada.

As espécies estudadas foram: *Mangifera indica*, *Artocarpus heterophyllus*, *Manilkara zapota*, *Citrus sinensis*, *Syzygium cumini* e *Vitis vinífera*. Dentre essas, a *Artocarpus heterophyllus* e *Citrus sinensis* foram as únicas que mostraram propriedade antiglicante e apresentaram potencial para serem usadas para o tratamento do diabetes crônica e suas complicações. Os flavonoides como a rutina, quercetina e quercetina-3-O-xilósido podem ser os responsáveis por esta atividade (SHAKTHI, 2014).

Extratos metanólicos de 26 plantas árabes foram testados individualmente, e 5 mostraram atividade antiglicante e antioxidante *in vitro*, a saber: *Sida cordifolia*, *Plumbago zeylanica*, *Tribulus terrestris*, *Glycyrrhiza glabra*, e *Rosa indica*. Também foi mostrada que a combinação de 5 plantas, tais como: *Salacia oblonga*, *Tinospora cordifolia*, *Emblica officinalis*, *Curcuma longa* e *Gymnema sylvestre*, formam um produto com potencial antiglicante e hipoglicemiante administrado em dose de 1000 mg por 8 semanas a 89 pacientes com diabetes tipo 2, conseguindo abaixar os níveis de glicose no sangue em jejum e pós-prandial e a porcentual de HbA1c (KURIAN, 2014; SIDDIQUI, 2016)

2.4 Gênero *Salacia*. *Ssp.*

O gênero *Salacia Ssp.* pertence a família Celastraceae com aproximadamente 200 espécies encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. Dentro da medicina folclórica, as *Salacia sp* são usadas para tratar o diabetes, obesidade, artrites, infecções microbianas e até mesmo o câncer. Diversos gêneros de *Salacia* podem ser encontrados na Índia, Sri Lanka, Amazônia Sul Americana, China e em outros países do Sudeste Asiático. Dentro das 21 espécies já identificadas, pesquisas realizadas com extratos de *S. reticulata*, *S. oblonga*, e *S. chinensis*, mostraram possuir uma boa atividade moduladora da glicação em lipídeos e glicose no sangue. Essas atividades estão diretamente vinculadas às funções citoprotetoras das células hepáticas, pancreáticas, renais, cardíacas e doenças neurodegenerativas (BASU, 2016; BHAT, 2012; MIRHASHEMI, 2016; MORIKAWA, 2015; SALAHUDDIN, 2014; SELLAMUTHU, 2013, SHIRAKAWA, 2016; SINGH, 2015).

Dentro de sua composição fitoquímica podemos encontrar o salacinol, kotalanol, ponkorinol, salaprinol, neosalaprinol e neoponkoranol, mangiferina, 16-acetato kotalagenina, epigallocatequina, epicatequina, epiafzelechin e pristemerina. Os sulfônio sulfatos como salacinol, kotalanol, ponkorinol, salaprinol são responsáveis pela atividade antidiabética; e seus análogos dessulfonado neosalaprinol e neoponkoranol inibem a enzima α -glicosidase (MOHAN, 2014).

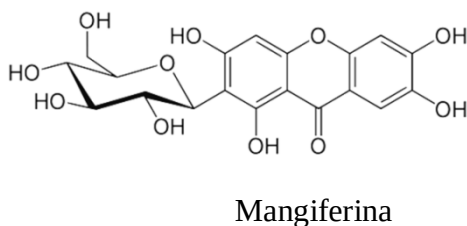
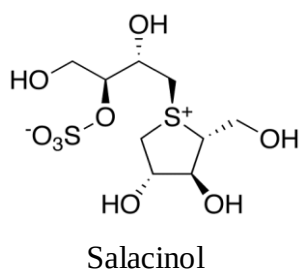


Figura 04: Estrutura química do salacinol e a mangiferina. Fonte: Adaptado de Morikawa, 2015.

A mangiferina é uma xantona antioxidante e neuroprotetora em modelo de neurônios cultivados com alta concentração de glicose, pela inibição na formação de radicais livres e AGEs ao aumentar a função da glioxalase 1 (Glo-1) que ativa a via de sinalização Nrf2/ARE; a 16-acetato de kotalagenina um triterpeno que inibe a aldose redutase e α -glicosidase (LIU, 2016B; MATSUDA, 1999; YOUSEF, 2016).

A pristimerina é um triterpenoide de quinonetona com ação anticancerígena que atua pela inibição da via de sinalização NF- κ B em células tumorais do cólon e do melanoma uveal. Esta inibe o TNF- α e o lipopolissacarídeo (LPS) que induz a ativação da via de sinalização NF- κ B e também inibe a ativação de células T induzidas por IL-2 (YOUSEF, 2018; ZHANG, 2017).

2.4.1 *Salacia oblonga*

A *Salacia oblonga* apresenta uma atividade anti-inflamatória por inibir a expressão do gene da Ciclooxigenase I (COX-1) e Ciclooxigenase II (COX-2) durante o processo inflamatório induzido em ratos. Sua ação envolve a diminuição da absorção de glicose e de gordura pelo intestino ao inibir a α -glucosidase intestinal e lipase pancreática, ela também ativa o transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) nos tecidos musculares que começam a captar mais glicose (KUSHWAHA, 2016).

Ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina foram tratados por 16 semanas com extrato hidroetanólico de *S. oblonga* (SOE) em doses de 50 e 100 mg/kg. Ao terminar o tratamento mostrou-se uma diminuição dose dependente significativa da glicose sanguínea e da HbA1c com um aumento dos níveis de insulina sérica (BHAT, 2012).

No Japão, foi realizado um estudo randomizado e duplo-cego de tolerância oral alimentar com 66 pacientes diabéticos, que foram divididos em 3 grupos: G-01, G-02 e G-03. O G-01 foi o grupo controle, G-02 ingeriram 240 mg de SOE e o G-03 receberam 480 mg de SOE. Como resultado o G-03 diminuiu da glicemia e a insulina pós-prandial no soro quando comparados com o G-02 e o G-02 diminuiu da glicemia e a insulina pós-prandial no soro quando comparados com o G-01. Estes resultados mostram a atividade hipoglicemiante do SOE ao diminuir a glicemia aguda em pacientes com DM2 (WILLIAMS, 2007).

2.4.2 *Salacia chinensis*

O extrato aquoso de *S. chinensis* (SCE) dos caules apresentam melhoria na resistência óssea ao diminuir a concentração de CML neste órgão, também diminuiu os níveis de corpos cetônicos, creatinina e glicalbumina sérica em ratos com DM1. Os ensaios mostram que estes efeitos são causados pelo aumento na captação de glicose pelos órgãos em ausência de insulina por dois mecanismos. Primeiro, ao substituir todos os carboidratos da dieta por glicose para observar a absorção intestinal da glicose. Segundo a cultura de miócitos esqueléticos L6 em presença de SCE começou a captar 2-desoxiglicose do meio. Isto indica que o SCE diminui a concentração plasmática de glicose e AGEs ao estimular a captação celular (SHIRAKAWA, 2016).

O SCE dos caules administrado em ratos não diabéticos melhorou a tolerância a carboidratos; em camundongos diabéticos geneticamente modificados (KK-Ay) diminuiu os níveis de HbA1c e de glicose pós-prandial após 28 dias de uma dieta hipercalórica. Outro estudo usou a mangiferina extraída da raiz de *S. chinensis* em dose de 40 mg/kg durante 30

dias em ratos DM2, mostrou uma melhora na glicemia, ácido úrico, ureia, creatinina, AST, ALT, e ALP no soro. Também apresentou um aumento da Glutathione reduzida (GSH) pancreática e a diminuição do marcador TBARS e hidroperóxidos, regeneração celular e hiperplasia do pâncreas que foi mostrado no exame histopatológico. Além disso, promoveu a diminuição do estresse oxidativo, protegeu as células betas pancreáticas com propriedades antidiabéticas não tóxicas (MORIKAWA, 2015; SELLAMUTHU, 2013; SELLAMUTHU, 2014).

2.4.3 *Salacia reticulata*

O tratamento de 8 semanas com o extrato aquoso de *S. reticulata* (ASR) em camundongos obesos diminuiu a gordura visceral e subcutânea, glicose, insulina e colesterol total do plasma. Em camundongos não obesos também se observou diminuição destes marcadores, porém de uma forma mais leve, o que pode ser devido ao aumento da atividade da lipase sensível a hormônio (LSH) envolvidos na lipólise. Também melhorou o tempo de reação latente a dor, quando comparado como o camundongo obeso não tratado. Este resultado mostra que sua atividade preveniu a neuropatia periférica diabética causada pelo acúmulo de AGEs. No exame histopatológico do fígado foi demonstrado que a degeneração gordurosa de hepatócitos, infiltração de células inflamatórias e necrose celular também foram melhoradas (AKASE, 2011).

As células 3T3-L1 precursoras de adipócitos foram tratadas com o extrato de *S. reticulata* e com indutores de diferenciação celular, obtendo como resultado a inibição da atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), diminuindo a concentração de adiponectina liberada. Também foi inibida a transcrição do PPAR- γ e C/EBP α que iniciam a indução e diferenciação do preadipócito para adipócito diminuindo assim a adipogênese e a

lipogênese. Não se encontrou evidência de glicerol no meio o qual indica que não houve lipólises (SHIMADA, 2011).

2.4.4 *Salacia impressifolia*

A *Salacia impressifolia* é um arbusto ou árvore com liana tipo trepadeira. Seu domínio geográfico é a Amazônia de México, Honduras, Nicarágua, Panamá, Venezuela, Guiana, Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia. Nativa do Brasil pode ser encontrado pelo Norte nos estados de Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e no Centro-Oeste no estado de Mato Grosso (AYURVEDIC, 2018; BOLETIM, 2018; REFLORA, 2018).

O gênero *Salacia* é classificado por alguns autores como parte da família Hippocrateaceae. Atualmente, a *S. impressifolia* possui a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Plantae,
Sub-reino: Tracheobionta,
Divisão: Magnoliophyta,
Classe: Magnoliopsida,
Subclasse: Rosidae,
Ordem: Celastrales,
Família: Celastraceae,
Gênero: *Salacia*
Espécie: *Salacia impressifolia*.



Figura 05: *Salacia impressifolia*

http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/hippocrateaceae/salacia_impressifolia/salacia_impressifolia.html

A *S. impressifolia* ou “cipó-miraruíra” como é conhecida no Brasil é usada pela medicina folclórica para tratar o diabetes ao diminuir a glicemia pós-prandial regularizando e equilibrando a taxa de glicose do sangue e como anti-inflamatório, antileucêmicas e anticancerígena (ALMEIDA, 1993).

A identificação química foi realizada pela obtenção de vários extratos por diferentes solventes entre eles clorofórmio, metanol, hexano e acetato de etila. Do extrato clorofórmico da casca do caule de *S. impressifolia* foram obtidas 18 frações que depois foram fracionadas com hexano/acetato de etila (8:2) onde identificou-se os seguintes triterpenos: 22-hidroxitengenona e friedelina. O extrato metanol do caule foi analisado por espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtendo o ácido 3-O- β -D-fucopiranosil quinóvico, ácido 3-O- β -D-quinovopiranosil quinóvico que é um triterpeno glicosilado derivado do ácido quinóvico, também foram identificados o ácido cinchólico e ácido quinóvico que pertencem às classes de triterpenos oleano e ursano. No extrato hexânico foram identificadas estruturas de friedelina e mistura de α e β amirina. No extrato Acetato foi identificado o triterpeno ácido 3-oxoquinóvico ao ser analisado por espectro de RMN ^1H e ^{13}C , as estruturas são mostradas na figura 06 (CALDAS, 2000; COSTA, 2006; RIPARDO, 2007; SILVA, 2016)

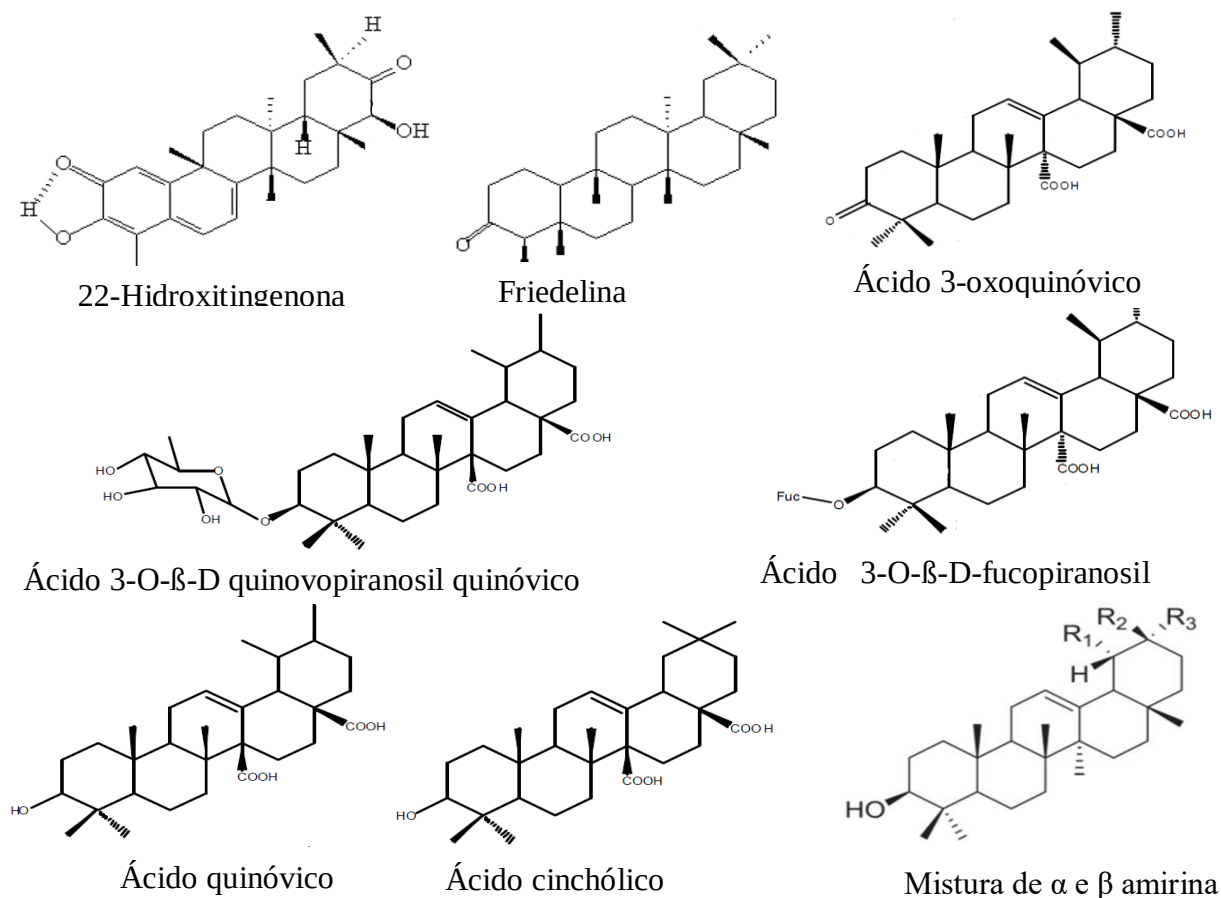


Figura 06: Triterpenos isolados de extratos Clorofórmio, Metanol, Hexano e Acetato de etila das cascas do caule de *S. impressifolia*. Fonte: adaptado de Caldas, 2000; Costa, 2006; Ripardo, 2007e Silva, 2016.

O extrato etanólico da casca do caule da *S. impressifolia* mostrou atividade inibitória específica das enzimas sacarase, maltase e lactase, na porção duodenal do intestino de rato *in vitro* e diminui a absorção de glicose no teste de tolerância oral à glicose mostrando ter atividade antidiabética. Também foram encontrados neste extrato o ácido melaléucico, epicatequina, α e β -amirina os quais foram caracterizados através de suas propriedades físicas (ponto de fusão e fator de retenção cromatográfica) e espectroscópicas (IV, EM e RMN uni e bidimensional) (DA LUZ, 2016; RUANI, 2014).

Do extrato etanólico de *S. impressifolia* foram obtidas as frações acetato de etila, clorofórmio e fração insolúvel. Onde o extrato e as frações clorofórmio e fração insolúvel diminuíram a glicemia em ratos não diabéticos no TTOG nas concentrações de 50 e 25 mg/kg (DA LUZ, 2016; RUANI, 2014). A fração clorofórmio (25 mg/kg) e a fração insolúvel (12,5 mg/kg) estimularam o aumento na concentração de insulina mostrando um efeito agudo na curva de tolerância oral a glicose em ratos não diabéticos (DA LUZ, 2016).

Ratos diabéticos tratados por 28 dias com extrato hidroetanólico de *S. impressifolia* na concentração de 200 mg/kg apresentaram diminuição da glicemia em jejum mostrando um efeito similar ao padrão glibenclamida (0,7 mg/kg). Além disso, apresentaram níveis aumentados de de HDLc e triglicerídeos quando comparados com o controle não diabético, porém menores em comparação ao grupo diabético não tratado, ausência de alteração no colesterol total, diminuição do TGO e aumento do TGP (MERLIN, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antidiabética de extratos de *Salacia impressifolia* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

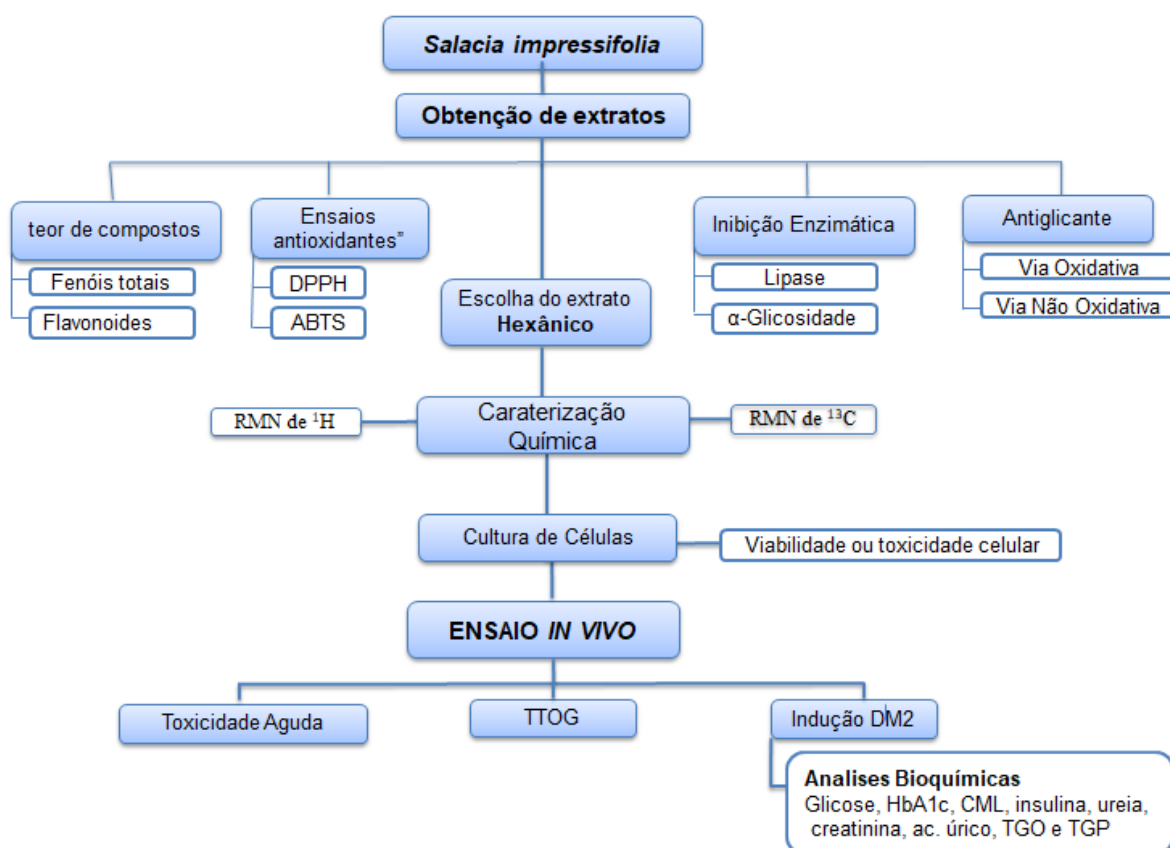
3.2 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar quimicamente extratos de *S. impressifolia* com atividade antidiabética;
- Caracterizar as atividades antioxidante, antiglicante e inibitória sobre enzimas digestivas dos extratos;
- Avaliar a toxicidade do extrato mais ativo;
- Estudar os efeitos hipoglicemiantes e antiglicação em modelos experimentais *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A obtenção dos extratos, quantificação de teor de compostos fenólicos e flavonoides, ensaios antioxidantes, inibição de enzimas digestivas, antiglicante e de viabilidade celular foram realizados nas instalações da faculdade de farmácia da UFAM. Os ensaios *in vivo* foram realizados no Biotério Central da UFAM e os análises de RMN foram realizados com a parceria do professor Hector Koolen nas instalações do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

4.1 Fluxograma Experimental



4.2 Matéria-prima

No presente estudo, as cascas de *S. impressifolia* foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke (km 26 da rodovia AM-010, o 18 de Abril 2014 no município de Manaus, estado do Amazonas, Brasil) a partir de um espécime previamente catalogado durante o projeto (Ribeiro et al., 1999). Um exemplar da excicata: A voucher specimen (#4699) foi depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Brasil. Norte:

4.3. Obtenção do Extrato

As cascas de *S. impressifolia*, após serem limpas e secas foram trituradas com um moinho de facas. As cascas foram maceradas por 3 dias a temperatura ambiente e macerados de forma sequencial começando pelo solvente mais apolar até o mais polar (Hexano, Acetato de etila, Metanol e Água-etanol). com uma relação de 100g por Litro. Depois as soluções extrativas foram filtradas e secadas no rotaevaporador para obtenção de extratos secos (SILVA, 2016).

4.4 Caracterização Química

A caracterização química foi realizada por meio da técnica de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para identificar as estruturas químicas dos compostos presentes no extrato hexânico de *S. impressifolia*. As análises de RMR foram realizadas no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) em um espectrômetro INOVA 500 da Varian operando a 11,7 Tesla (T). Os núcleos observados foram o de ^1H a 500 MHz, e de ^{13}C a 125 MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) para a realização dos experimentos. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm

relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.5 Ensaio *in vitro*

4.5.1 Teor de fenólicos totais

A concentração de fenóis totais foi quantificada pelo método descrito por Kim et al., (2003). Inicialmente, 10 μ L dos extratos em uma concentração de 1 mg/ml foram colocados em cada poço mais 50 μ L de Folin&Ciocalteu's phenol 10% e incubados no escuro por 8 minutos a temperatura ambiente. Logo após esse tempo foi realizado a primeira leitura na absorbância em 620 nm, depois foi adicionado uma solução saturada de carbonato de sódio 0,4% e incubado novamente por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura na absorbância em 620 nm no leitor de microplaca (Multimode Detetor DTX 800 da Beckman), o teor fenólico das amostras foi expressa em porcentual comparados com padrão ácido gálico e também como μ g equivalente a ácido gálico (μ gEqAG) quando comparado à diluição consecutiva do padrão.

$$\text{Fenóis totais (\%)} = (\text{Abs}_a / \text{Abs}_p) \times 100$$

Abs_a =Absorbância da Amostra (final - inicial)

Abs_p =Absorbância do Padrão (final - inicial)

4.5.2 Teor de Flavonóides Totais

A quantificação de flavonoides totais foi considerando pelo método descrito por Kumar et al., (2008). Inicialmente foi adicionado 30 μ L do extrato na concentração de 1 mg/mL mais 90 μ L de etanol para tirar o branco realizando a primeira leitura no comprimento de onda 405 nm. Após a leitura foi colocado 6 μ L de cloreto de alumínio 10%, 6 μ L de acetato de

potássio, 168 µL etanol nas microplacas e incubadas por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após a incubação foi realizada a leitura no comprimento de onda 405 nm no leitor de microplaca. O cálculo foi semelhante da quantificação de fenóis totais. O padrão usado foi a quercetina e os resultados foram apresentados em porcentual e em µg equivalentes a quercetina (µgEQ).

$$\text{Flavonoides totais (\%)} = (\text{Absorbância amostra} / \text{Absorbância padrão}) \times 100$$

4.5.3 Atividade sequestrante do Radical DPPH[•]

A atividade sequestrante do radical lipossolúvel DPPH[•] foi realizada segundo metodologia utilizada por Burits e Bucar (2000) com modificações para possibilitar que o teste fosse realizado em microplacas de 96 poços. Foi preparada uma solução de 0,05 µg/mL de DPPH[•] em etanol, 30 µL do extrato, padrão e/ou controle (DMSO) na concentração de 1 mg/mL foram adicionados a cada um dos poços da microplaca e colocadas em contato com a solução de DPPH[•]. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e a leitura foi realizada em 492 nm no leitor de microplaca.

Os cálculos de porcentual de inibição (inibição %) foram realizados baseando-se na absorbância do controle e utilizando o programa Excel. Quando o porcentual de inibição foi maior a 50%, foram realizadas até 8 diluições consecutivas para obtenção dos valores de CI₅₀, calculados pelo programa GraphPad Prism, versão 6.0. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_a / \text{Abs}_c] \times 100.$$

Abs_a=Absorbância da Amostra

Abs_c=Absorbância do controle

4.5.4 Atividade sequestrante do radical ABTS*

A fim de determinar a atividade antirradical ABTS*, o ensaio foi realizado mediante o método descrito por Shanty (2017) com modificações. Inicialmente, foi preparada a solução de ABTS* 0,7 mM em 5 mL de água deionizada e 5 mL de persulfato de potássio 2,4 mM. Em seguida, incubou-se a mistura reacional em temperatura ambiente na ausência de luz por 12 horas para obtenção de uma solução oxidada de tonalidade azul esverdeada. Antes de plaquear, o ABTS* oxidado foi diluído (1:5) com água deionizada, após o plaquamento incubou-se por 15 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente e realizou-se a leitura no leitor de microplaca em 620 nm. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI_{50} foi calculado através do programa GraphPad Prism 6.0. O padrão utilizado foi o ácido gálico;

$$\% \text{ inibição} = 100 - [Abs_a / Abs_c] \times 100.$$

4.5.5 Atividade inibidora α -glucosidase de Murino

A atividade enzimática foi determinada de acordo à Andrade-Cetto et al., (2008) com ligeiras modificações. A enzima α -glucosidase foi extraída do pó cetônico do intestino de rato da SIGMA. Tanto o substrato 4-ítrofenil-D-glucopiranósido (4-NPGP) como a enzima foram diluídos em tampão fosfato 10mM pH 6,9. Primeiramente, preparou-se a enzima numa concentração de 3 mg/mL do pó cetônico do intestino de rato, agitou-se esta mistura por 5 minutos, e centrifugou-a a 3600 rpm por 10 minutos, seguido da retirada do sobrenadante que contendo a enzima α -glucosidase extraída. Em seguida, colocou-se 30 μ L do extrato, padrão e/ou controle (DMSO) na concentração de 1 mg/mL nos diferentes poços da microplaca em

triplicata, 170 µL da enzima (0,08 µg/mL), incubou-se por 5 minutos a 37°C no escuro, adicionou-se 100 µL do 4-NPGP (5mg/ml), incubou-se por 20 minutos ou até que a leitura do controle a 405 nm apresentasse Absorbância de $1,000 \pm 0,1$ no leitor de microplaca. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e o CI_{50} e calculado através do programa GraphPad Prism 6.0. O padrão utilizado foi a Acarbose.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_A / \text{Abs}_C] \times 100$$

4.5.6 Atividade inibitória da lipase

A atividade enzimática foi determinada de acordo à Slanc et al., (2009) com modificações. A lipase pancreática tipo II de porcino da SIGMA foi diluída em tampão TRISMA-HCL 75 mM pH 8,5 e para preparar o substrato palmitato de *p*-nitrofenila (PNP) diluiu-se primeiro em acetonitrila e depois em etanol na proporção de 1;4. O padrão usado foi o Orlistat. As leituras foram realizadas no leitor de microplaca à 450 nm. Colocou-se 30 µL do extrato, padrão e/ou controle (DMSO) nos diferentes poços da microplaca em triplicata, 250 µL da enzima (0,8 mg/mL), incubou-se por 5 minutos a 37°C no escuro, adicionou-se 20 µL de PNP (4 mg/mL), incubou-se por 10 minutos ou até que a leitura do controle de $1,000 \pm 0,1$. Os cálculos do porcentual de inibição foram realizados e as amostras que derem uma inibição maior de 50% foram diluídas em concentrações seriadas para determinação da CI_{50} .

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Abs}_A / \text{Abs}_C] \times 100$$

4.5.7 Atividade antiglicante: Via Oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo com Kiho (2004), com modificações. A reação foi efetuada em triplicata com concentrações de: Albumina (BSA) 8 mg/mL, Glioxal 30 mM, e 1 mg/mL do extrato. As soluções de glioxal e BSA foram diluídas em tampão fosfato (200 mM, pH 7.4), contendo azida de sódio 3 mM como agente antimicrobiano. Os 300 µL da mistura total da reação foram compostos por: BSA (135 µL), glioxal (135 µL) e DMSO ou extrato (30 µL) sendo incubados à 37°C durante 24 horas (em condições estéreis e no escuro). Após a incubação, cada amostra foi analisada no leitor de microplaca pela intensidade da fluorescência (emissão λ 330 nm e excitação λ 420 nm). A quercetina foi utilizada como padrão e o DMSO como controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentual de inibição e a CI_{50} foi calculado através do programa GraphPad Prism 6.0.

$$\% \text{ inibição} = 100 - [\text{Fluor}_A / \text{FLuor}_C] \times 100$$

Onde: Fluor_A = Fluorescência da Amostra

Fluor_C = Fluorescência do Controle

4.5.8 Atividade antiglicante: Via não oxidativa

A atividade antiglicante foi determinada de acordo à Kiho et al. 2004 com modificações. Foram seguidos os passos usados na Atividade antiglicante por via oxidativa, com exceção do glioxal que foi substituído pela frutose (100 mM) e o tempo de incubação aumentou para 120 horas.

4.5.9 Ensaio de citotoxicidade ou viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com Nakayama, (1997). A linhagem celular de macrófagos MRC-5 foram plaqueadas (5×10^3 células/poço) em placas de cultura de tecidos de 96 poços até um volume final de 100 μ L por poço. Após 24 horas, realizou-se o tratamento com o extrato hexânico diluídos 7 vezes começando na concentração de 100 μ g/mL durante 24 e 72 horas, após incubação, adicionou-se a solução Alamar Blue (10 μ L de Azul Alamar 0,4 % (resazurina em PBS) e incubou-se as células durante 3 horas a 37 °C. A fluorescência foi medida por excitação a 545 nm e emissão a 595 nm no leitor de microplaca. Como controle positivo de morte celular foi utilizada a doxorrubicina (5 μ g/mL) e como controle negativo o meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata de experimentos independentes e expressos como percentagem de viabilidade celular.

$$\% \text{ Viabilidade} = F_t \times 100 / \Delta F_b$$

Onde: F_t = (fluorescência da célula + meio + substância + resazurina)

ΔF_b = (fluorescência da célula + meio + resazurina)

4.6 Modelos experimentais *in vivo*

Para este estudo foram usados camundongos Balb/C albinos, machos, 6 semanas de idade, pesando 18 - 20 gramas, obtidos do Biotério Central da UFAM; Manaus. Eles foram mantidos sobre condições padrão de laboratório (Ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 21 ± 2 ° C e umidade relativa de 35 % a 60 %) e foram alimentados com rações e água já padronizados pela instituição.

Nos modelos *in vivo* as doses do extrato hexânico foram de 100 e 50 mg/kg de peso (EHSI50 e EHSI100), baseado no teste de citotoxicidade celular *in vitro*, toxicidade aguda *in vivo* e dos trabalhos realizados por Merlin, 2015 e Da luz, 2016.

Para o Teste de Atividade Hipoglicemiante aguda e crônica os animais foram divididos aleatoriamente em sete animais diabéticos por grupo. Os grupos foram divididos da seguinte maneira: grupo controle normoglicêmico não tratado (ND); grupo controle positivo – hiperglicêmico sem tratamento (CTL); grupo padrão Metformina 300 mg/kg (METF300) e os grupos testes (EHSI50 e EHSI100).

4.6.1 Análises de Toxicidade Aguda

Para o teste de toxidade aguda considerou-se o experimento sugerido pela OECD 423 (2001). Foram usados 3 camundongos machos, que receberam uma dose de 2000 mg/kg do extrato Hexânico (EHSI) em 5 doses fraccionadas com intervalo de 10 minutos. Os animais ficaram em observação constante as primeiras 12 horas e depois continuaram sobre observação por 14 dias. Neste ensaio foi analisado o óbito dos animais.

4.6.2 Teste de tolerância oral à Glicose – TTOG

O teste de tolerância oral à glicose foi realizado de acordo com Andrade-Cetto et al., (2008) com modificações. Os camundongos não diabéticos foram divididos em 4 grupos de 6 animais (Grupos descritos anteriormente) e padronizados com 18-20 gramas de peso para os testes. Posteriormente, foram mantidos em jejum de 12 horas e após esse tempo, foi realizada a primeira coleta de sangue da veia da cauda de todos os animais dos grupos para o doseamento

basal da glicose. Foi administrado por via oral no Grupo Controle (CTL) soro fisiológico-200µL, o grupo Padrão (METF300) recebeu 300 mg/kg de Metformina e os grupos testes receberam o extrato hexânico de *S. impressifolia* em doses 100 e 50 mg/kg (EHSI50 e EHSI100), e após 20 minutos foi realizada a administração de 4 g/kg da glicose por via oral (gavagem) em todos os grupos.

As amostras de sangue foram recolhidas por punção com a ajuda de uma lanceta a partir da ponta da cauda a diferentes pontos de tempo (15, 30, 60 e 90 minutos) após a administração de glicose. A Glicemia foi mesurada usando um glicosímetro Precision Xtra (Abbott Diabetes Care, Portugal), colocando uma pequena gota de sangue em uma nova tira de teste e registrar as medições.

4.6.3 Teste de Atividade Hipoglicemiante Crônico DM2

Este teste será realizado seguindo o método descrito por Sun, (2015). Os camundongos machos normais foram divididos em cinco grupos de cinco animais (grupos descritos anteriormente), Após 4 semanas de pretratamento com uma dieta hiperlipídica (20% de sacarose, 10% de banha de porco, 2,5% de colesterol, 1% de cloreto de sódio e 66,5% de ração comum), os camundongos permaneceram em jejum de 8-12 horas (durante o período noturno) e após esse tempo, foi realizada a primeira coleta de sangue da veia da cauda de todos os camundongos dos grupos para o doseamento basal da glicose. Logo após, foi induzida o diabetes tipo 2 por administração intraperitoneal de estreptozotocina (35 mg/kg; diluído em tampão salino citrato 0,1 M – pH 4,5) por 7 dias uma vez por dia, com água e dieta hiperlipídica a bondade, logo após 2 semanas da indução foram considerados diabéticos do tipo 2 os animais com uma glicemia maior ou igual a 250 mg/dl em jejum e usados no estudo.

A partir da confirmação do diabetes, iniciou-se o tratamento em todos os animais durante um período de 25 dias, sendo administrado diariamente por via oral: no grupo Controle (CTL) e Normoglicêmico (ND) o veículo (3% de Kolliphorem; soro fisiológico - 200 μ L), o grupo Padrão (METF300) recebeu 300 mg/kg de Metformina, os grupos Testes (EHSI50 e EHSI100) receberam o extrato hexânico de *S. impressifolia* em doses 100 e 50 mg/kg.

O período de 25 dias de tratamento foi escolhido para avaliar melhor os produtos da glicação como a HbA1c e a CML, a cada 5 dias foram realizadas dosagens para medição da glicemia e a pesagem dos grupos. Ao final do tratamento os animais foram anestesiados do por via intraperitoneal com Cetamina e Xilazina (1:1; 50 mg/kg de peso) e coletado o sangue por punção cardíaca para a dosagem dos parâmetros bioquímicos, depois realizou-se a eutanásia por deslocação cervical. A glicose no sangue foi medida usando um glicosímetro Precision Xtra (Abbott Diabetes Care, Portugal), colocando uma pequena gota de sangue em uma nova tira de teste e registrar as medições. O Tratamento foi iniciado a partir da confirmação do diabetes.

3.7 Análises bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no final do tratamento, antes da eutanásia para determinação do perfil glicêmico (Glicose, HbA1c, CML, insulina) perfil lipídico (Colesterol, triglicerídeos e HDLc), perfil hepático (TGO e TGP) e perfil renal (Ácido úrico, creatinina e ureia). As dosagens foram determinadas utilizando um analisador automático Chem WellModel 2910; AWARENESS TECHNOLOGY, INC e Kits Comerciais disponíveis enzimáticos e ELISA.

4.7 Aspectos Éticos: CEUA

Como este projeto de pesquisa envolveu a utilização de animais de laboratório, o mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFAM com o protocolo N° 01/2016-CEUA/UFAM.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos com as médias e os desvios-padrão de medições em triplicatas/quadruplicadas. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio do programa GraphPad Prism 6. Os valores da concentração inibitória 50% (CI₅₀) foram obtidos por regressão não-linear de curvas concentração-resposta. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Foram obtidos extratos brutos extraídos em solventes de diferentes polaridades os quais foram submetidos a ensaios químicos preliminares e de atividade biológica em testes *in vitro* e *in vivo*.

5.1 Rendimentos dos extratos

Na tabela 01, foi calculado o rendimento dos extratos obtidos com 100 g de casca de *S. impressifolia* por litro de em solventes de alta, média e baixa polaridade.

Tabela 01: Rendimento dos extratos obtidos em solventes de diferentes polaridades em de 100 g da casca de *S. impressifolia*.

Solvente	Rendimento (%)
Hidroetanólico (50:50)	7,8
Metanol	5,9
Acetato de etila	0,9
Hexano	2,4

5.2 Caraterização Química

O extrato em hexano das cascas do caule de *S. impressifolia* por ser o mais bioativo foi escolhido para ser analisado diretamente por RMN de ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H (Figura 07) apresentou sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos como os majoritários. Além destes, sinais de hidrogênios carbinólicos, olefínicos e de grupamento acetil também foram observados (Figura 07). O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais de carbonos típicos de metilas blindadas, metilas desblindadas, carbonos carbinólicos, carbonos olefínicos e carbonos típicos de carbonilas α,β -insaturadas (Figura 08). A análise do perfil de sinais de hidrogênio e carbonos observados, em conjunto com dados químicos previamente publicados para a espécie *S. impressifolia* (Silva et al., 2016) confirmam a presença de triterpenos quinonametídeos como as substâncias majoritárias no extrato analisado.

Como o estudo químico desta espécie já foi publicado foi possível inferir quais compostos seriam os majoritários neste extrato, e desta forma, correlacionar os resultados biológicos com estruturas químicas. Dentre as substâncias presentes, os triterpenos quinonametídeos tingenona, 22 β -hidroxitingenona, priestimerina e 30-hidroxipriestimerina (Figura 09) destacaram-se por serem as majoritárias. Todas estas substâncias foram previamente descritas para esta espécie (Silva et al., 2016). Adicionalmente, por meio da integração das áreas dos sinais chave estimou-se quais compostos seriam os majoritários no extrato. Através desta análise concluiu-se que a tingenona e seu derivado hidroxilado na posição 22 são as moléculas majoritárias no extrato testado.

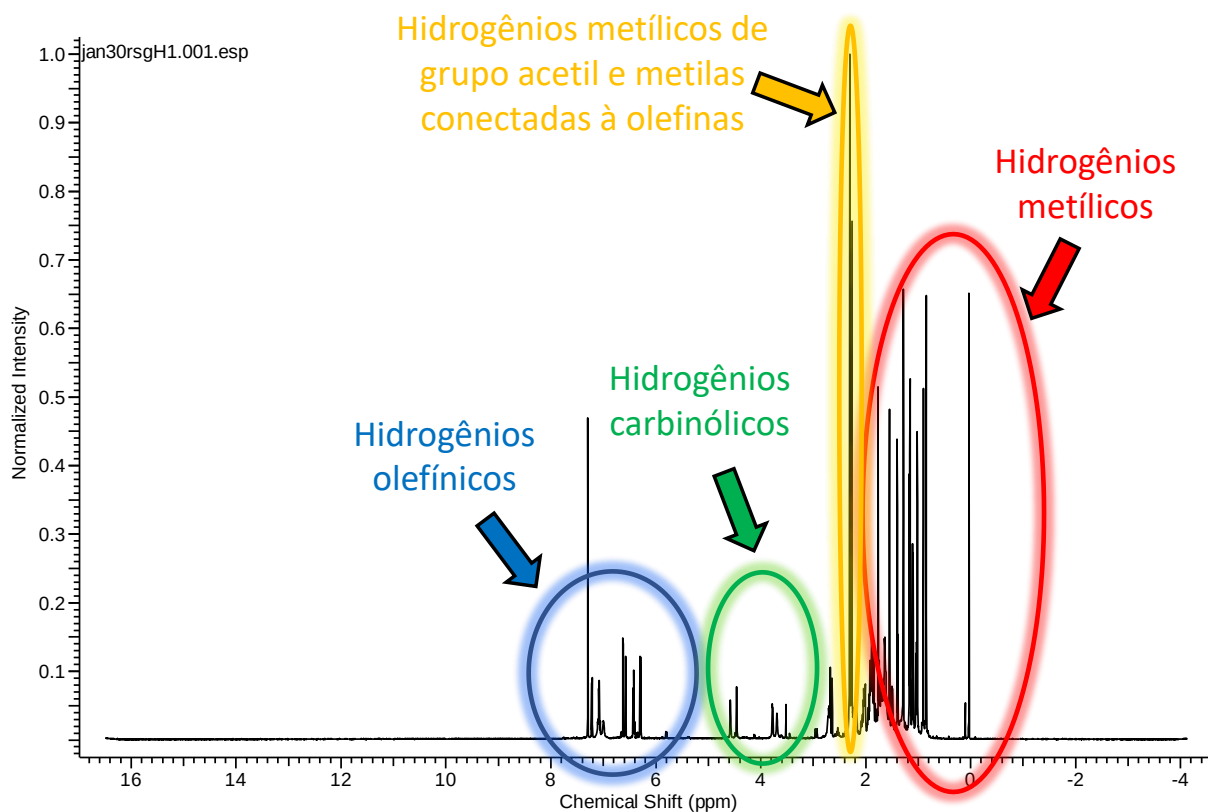


Figura 07: RMN de ^1H geral do extrato em hexano após procedimento em SPE.

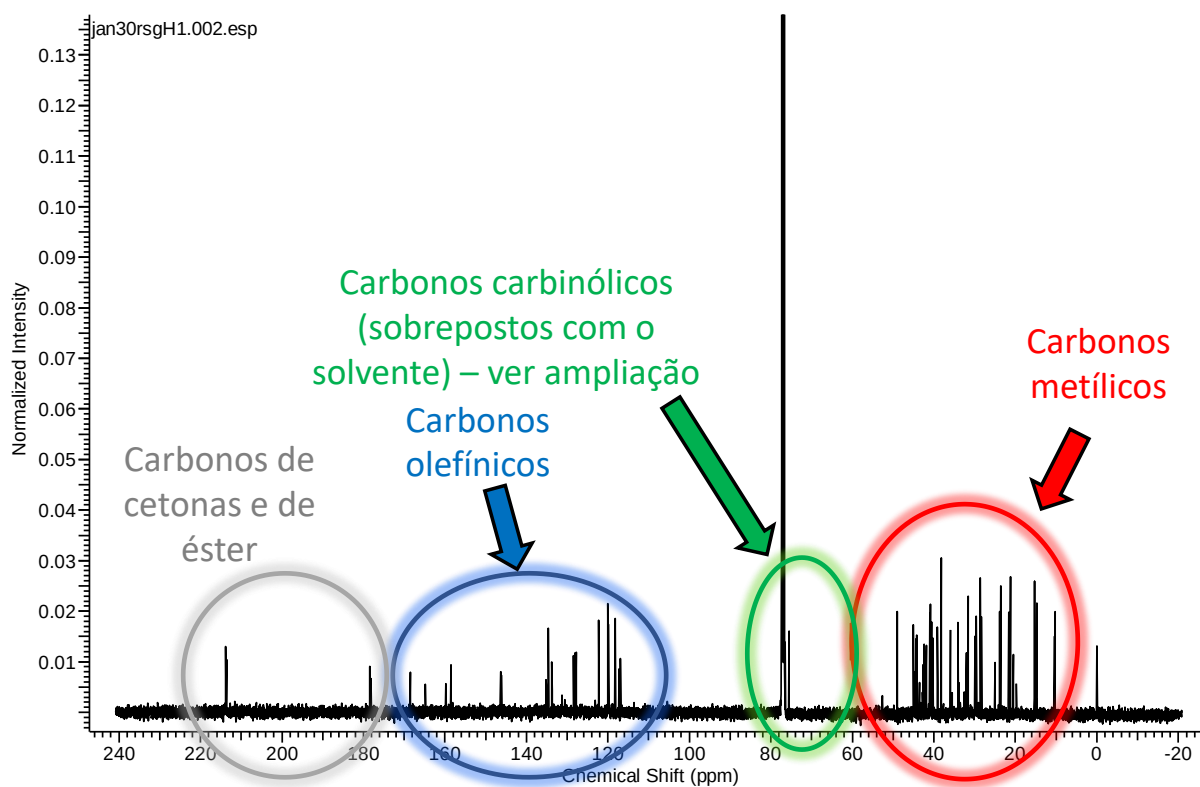
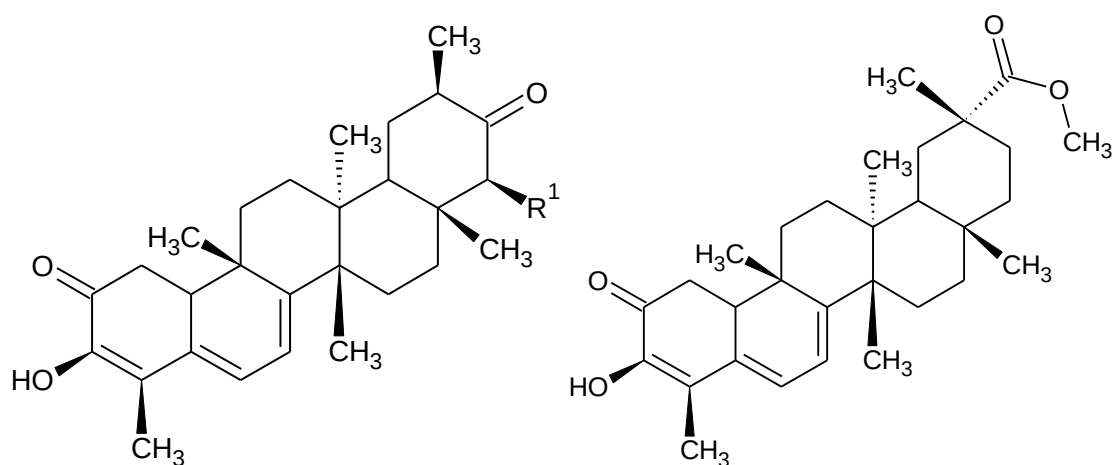


Figura 08: RMN de ^{13}C geral do extrato em hexano após procedimento em SPE.



	R ₁		R ₂
Tingenona	H	Pristimerina	CH ₃
22-hidroxitingenna	β -OH	30-hidroxi pristimerina	CH ₂ OH

Figura 09: estruturas dos compostos maioritários encontrados no extrato hexânico; Tingenona, 22-hidroxitingenona, Pristimerina e 30-hidroxi pristimerina. Adaptada de Silva, 2016.

5.3 Testes *in vitro*

5.3.1 Teor de Fenóis e flavonoides.

Os extratos foram submetidos a análise tenor de fenóis e flavonoides, apresentada na tabela 02. O ensaio de quantificação de fenóis e flavonoides totais evidenciou que dentre os extratos da *S. impressifolia* testados, o extrato hidroetanólico foi o que apresentou maior percentual de fenóis ($32,34 \pm 0,52\%$) e mg eq Ác Gálico/g ($218,95 \pm 3,59$). O extrato Acetato de Etila foi o que apresentou maior percentual de flavonoides ($15,22 \pm 0,67\%$) e mg eq Quercetina/g ($77,81 \pm 3,66$). Os seguintes resultados estão representados na Tabela 02.

Tabela 02: Quantificação do total de fenóis e Flavonoides dos extratos de *S. impressifolia*. Os resultados são expressos em percentual (%), em mg eq Ac Gálico/g a e mg eq Quercetina/g. Cada dado representa à média e o desvio padrão (DP) dos extratos em triplicata.

<i>S. Impressifolia</i>		Fenóis totais		Flavonoides totais	
Extrato	% fenóis	mg eq Ac Gálico/g	%flavonoide	mg eq Quercetina/g	
Hidroetanólico	$32,34 \pm 0,52^a$	$218,95 \pm 3,59^a$	$1,35 \pm 0,28^a$	$2,75 \pm 0,05^a$	
Metanólico	$28,49 \pm 1,28^b$	$192,42 \pm 8,83^b$	$7,60 \pm 1,33^b$	$36,11 \pm 7,29^b$	
Acetato de Etila	$25,91 \pm 0,21^c$	$174,61 \pm 1,43^c$	$15,22 \pm 0,67^c$	$77,81 \pm 3,66^c$	
Hexânico	$7,54 \pm 0,47^d$	$48,07 \pm 3,23^d$	$1,47 \pm 0,26^a$	$2,54 \pm 1,45^a$	

As Letras diferentes na mesma coluna indicam uma diferencia estatística significativa pelo teste Tukey, $p < 0,05$.

5.3.2 Atividade antioxidante sobre os radicais DPPH* e ABTS* *in vitro*

Os extratos foram submetidos a análise de inibição dos radicais DPPH* e ABTS* o qual está apresentada na figura 10. Os resultados foram expressos em percentual de inibição e posteriormente foi realizada a diluição seriada dos extratos de *S. impressifolia* para a obtenção da concentração inibitória do 50% (CI₅₀) que foram expressas em µg/mL: Hidroetanólico (EhSI) $19,95 \pm 0,45$ e $5,4 \pm 0,03$, metanólico (EMSI) $17,05 \pm 0,32$ e $8,07 \pm 0,35$, acetato de etila

(EASI) $24,17 \pm 0,2$ e $9,65 \pm 0,5$, hexânico (EHSI) com $125,12 \pm 1,85$ e $97,55 \pm 3,54$ e o padrão ácido gálico (AG) com $2,87 \pm 0,06$ e $2,54 \pm 1,45$. Estes resultados mostraram significância estatística no *One-way* ANOVA pelo teste de Tukey, $p < 0,05$.

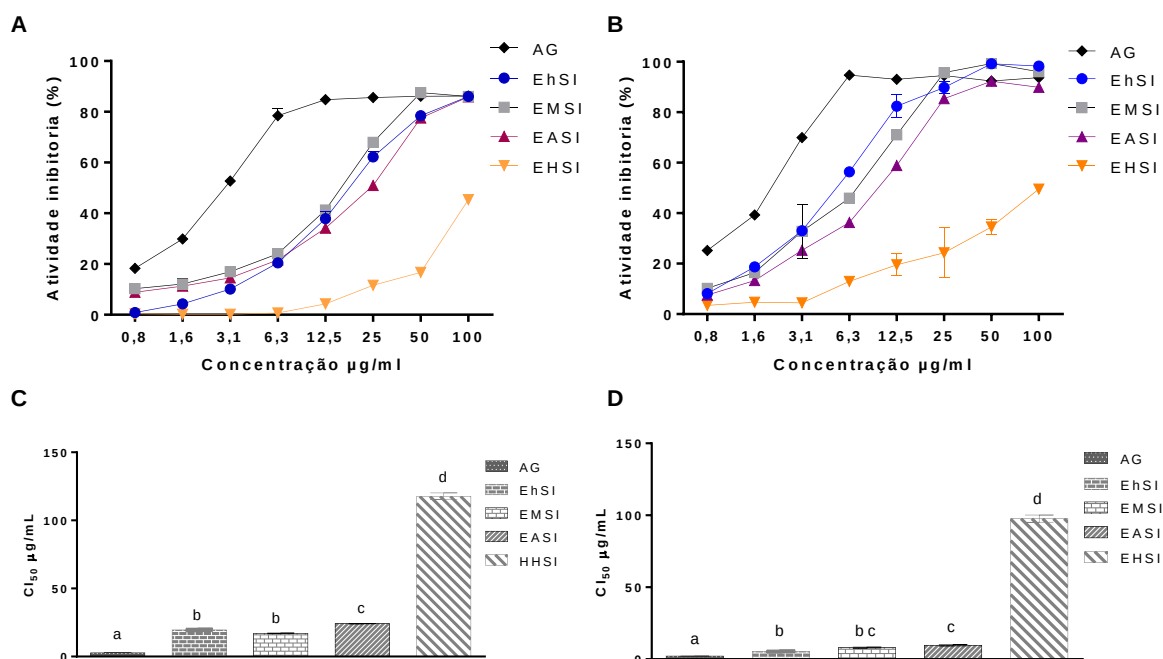


Figura 10: Atividade inibitória (%) dos extratos de *S. impressifolia*: Hidroetanólico (EhSI), Metanólico (EMSI), Acetato de etila (EASI) e Hexânico (EHSI) sobre os radicais DPPH[•] (A) e ABTS[•] (B) em diferentes concentrações. Atividade antioxidante expresso em CI₅₀ dos extratos (EhSI, EMSI, EASI e EHSI) frente aos radicais DPPH (C) e ABTS (D) onde o padrão usado como controle positivo foi o ácido gálico (AG). As letras diferentes indicam uma diferença estatística significativa pelo teste *One-way* ANOVA de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

5.3.3 Atividades inibitórias das enzimas digestivas α -glucosidase e lipase *in vitro*.

Os extratos foram submetidos a análise de inibição das enzimas lipase e α -glucosidase as quais estão apresentadas na figura 11. O padrão utilizado para o teste de inibição da enzima α -glucosidase foi a acarbose (ACB) e a concentração usada tanto para o padrão como para os extratos foi de 100 µg/mL. Neste ensaio a enzima foi extraída do pó cetônico do intestino de rato e os resultados foram expressos em inibição (%): EhSI ($33,56 \pm 0,76\%$), EMSI

(10,46±0,17%), EASI (8,24±0,53%), EHSI (31,67±2,1%) e ACB (65,55±0,43%). Notou-se que os extratos não apresentam um percentual significativo de inibição (%) para a enzima α -glucosidase, por não ser maior que 50%, por esse motivo não foram realizadas as diluições para a obtenção do CI₅₀.

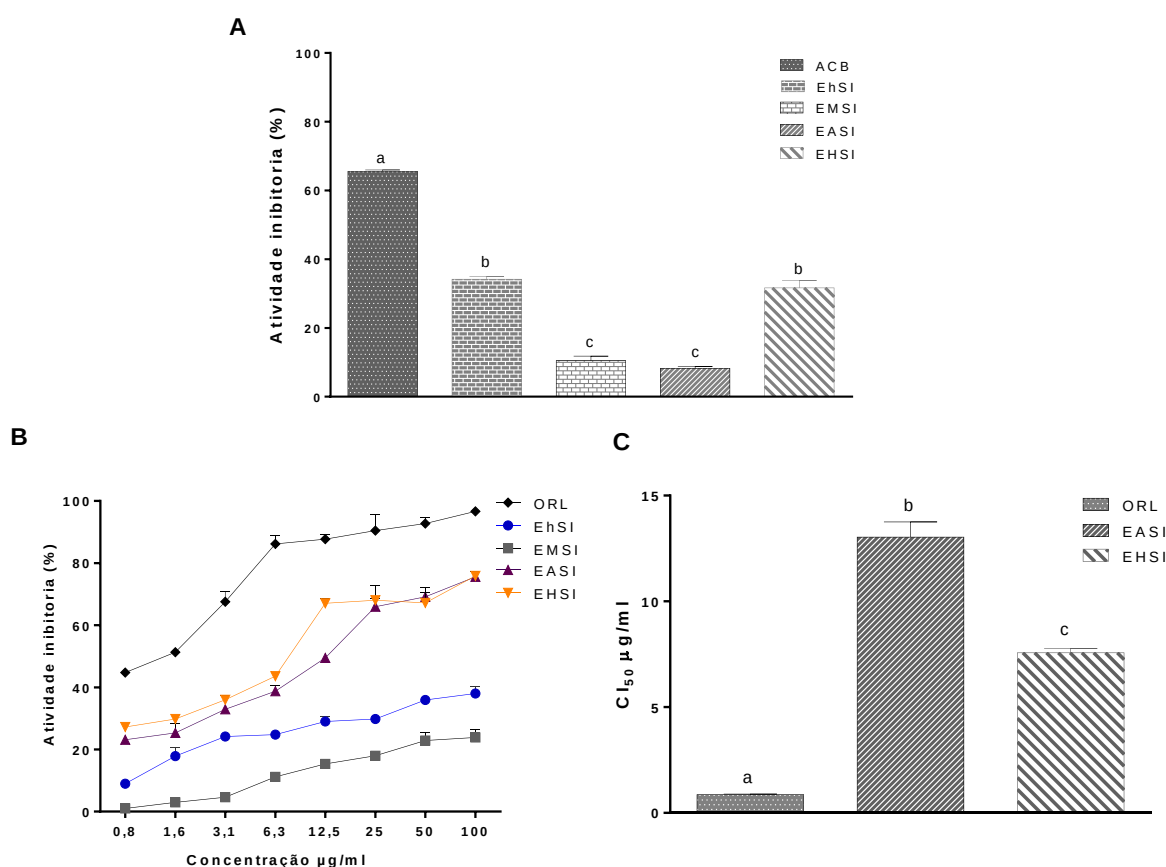


Figura 11: Atividade inibitória (%) dos extratos de *S. impressifolia*: Hidroetanólico (EhSI), Metanólico (EMSI), Acetato de etila (EASI) e Hexânico (EHSI) sobre a enzima α -glucosidase na concentração de 100 µg/mL (A), Atividade inibitória (%) dos extratos em diferentes concentrações sobre a enzima Lipase (B), Atividade inibitória da lipase do EASI e EHSI expressados em CI₅₀ (C). Os padrões utilizados para comparar os extratos foram: Acarbose (ACB) para inibição da enzima α -glucosidase e Orlistat (ORL) para a inibição da enzima lipase. As letras diferentes indicam uma diferença estatística significativa pelo teste One-way ANOVA de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

Os resultados referentes à inibição da enzima lipase mostraram que só os extratos EASI e EHSI obtiveram uma inibição (%) maior de 50% na concentração de 100 µg/mL, por esse motivo, só foi realizada as diluições destes extratos para a obtenção da CI₅₀.

O Orlistat (OLT) apresentou CI_{50} de $0,86 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$, o EASI $13,03 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ e o EHSI $7,6 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ mostrando-se mais ativo para este ensaio o EHSI. Estes dados mostram ser diferentes segundo a teste One-way ANOVA de Tukey, com $p < 0,05$.

5.3.4 Atividade antiglicante por via oxidativa e não oxidativa in vitro.

Os extratos foram submetidos a análise antiglicante por via oxidativa e não oxidativa e os resultados foram expressos na figura 12. A aminoguanidina foi utilizada como padrão para o teste antiglicante por via não oxidativa e verificou-se que todos os extratos apresentaram atividade inibitória (%) maior que 50% por esta via. Como seguinte passo foram realizadas as diluições de cada extrato para calcular a CI_{50} obtendo os seguintes resultados: EhSI ($11,3 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$), EMSI ($20,2 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), EASI ($19,7 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$), EHSI ($28,7 \pm 1 \mu\text{g/mL}$) e $28,6 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$ da aminoguanidina (Ag). Na análise estatística utilizou-se teste One-way ANOVA de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$ que mostrou significância estatística no teste.

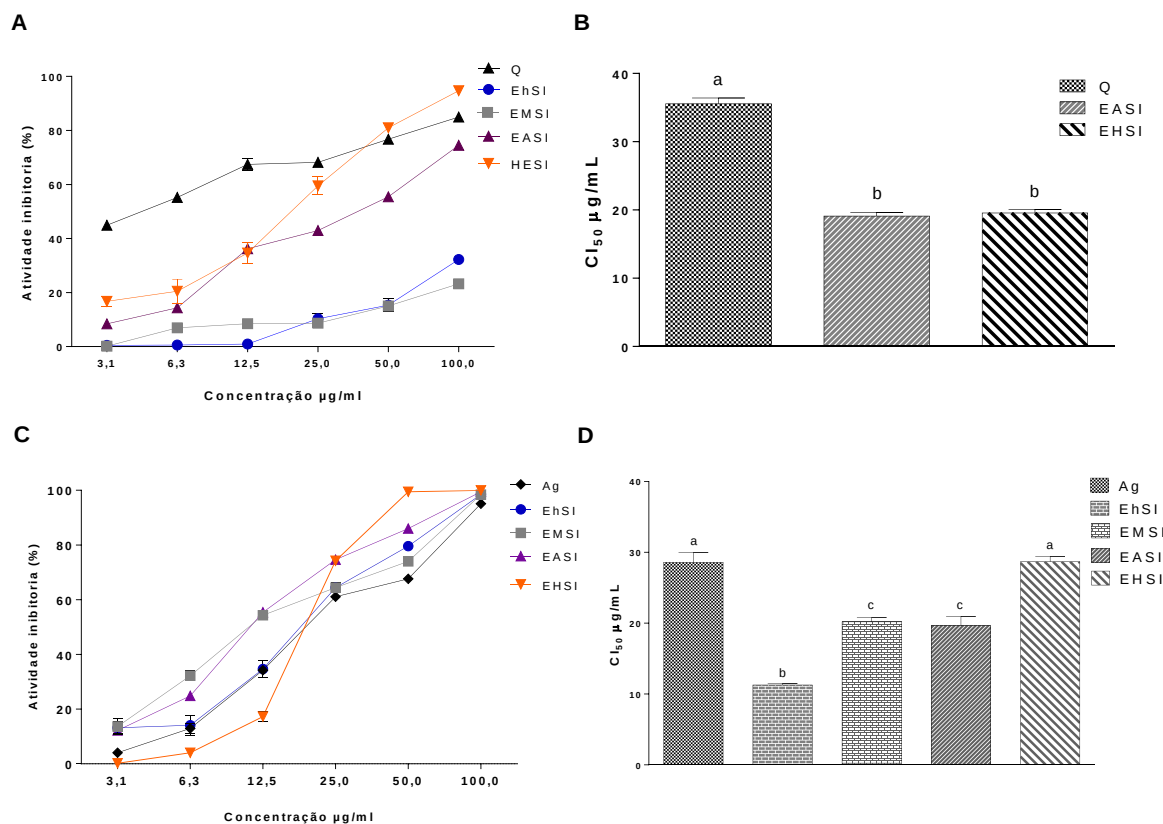


Figura 12: Atividade inibitória (%) dos extratos de *S. impressifolia*: Hidroetanólico (EhSI), Metanólico (EMSI), Acetato de etila (EASI) e Hexânico (EHSI) sobre a glicação por via oxidativa (A) e a CI₅₀ dos extratos por esta via (B). Atividade inibitória (%) dos extratos de *S. impressifolia* sobre a glicação por via não oxidativa (C) e a CI₅₀ dos extratos por esta via (D). Os padrões usados são a Quercetina (Q) para a inibição da glicação por via oxidativa e Aminoguanidina (Ag) para a via não oxidativa. As letras diferentes indicam uma diferença estatística significativa pelo teste One-way ANOVA de comparação múltipla de Tukey, $p < 0,05$.

A Quercetina foi usada como padrão para inibir a glicação por via oxidativa. Onde os extratos EMSI com $32,200 \pm 0,6\%$ e o EhSI com $23,3 \pm 1,2\%$ não mostraram uma atividade inibitória (%) significativa por esta via. Os extratos com melhor atividade na inibição (%) foram EASI com $74,5 \pm 0,6\%$ e CI₅₀ de $17,6 \pm 0,4$ µg/mL e o EHSI com $80,9 \pm 1,2\%$ e CI₅₀ de $19,6 \pm 0,5$ µg/mL. Estes resultados mostraram uma CI₅₀ menor que a da Quercetina (Q), a qual apresentou uma inibição (%) de $84,9 \pm 0,3\%$ e uma CI₅₀ de $35,6 \pm 0,9$ µg/mL. Na análise estatística utilizou-se One-way ANOVA de Tukey, $p < 0,05$ o que demonstra diferença significativa do teste.

5.4 Ensaio Celular *in vitro*

5.4.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular mostrou ser doses-dependente e a concentração letal de 50% (CL₅₀) do extrato hexânico, foi calculado em HillSlope “No constraint” por se tratar de um extrato e não de uma substância pura; com um intervalo de confiança de 95%. Sendo de 13,06 µg/ml (11,28 -15,12) e 12,25 µg/ml (10,97 - 13,67) para o tempo de 24 e 72 horas, evidenciando uma leve toxicidade nas células como mostra a figura 13.

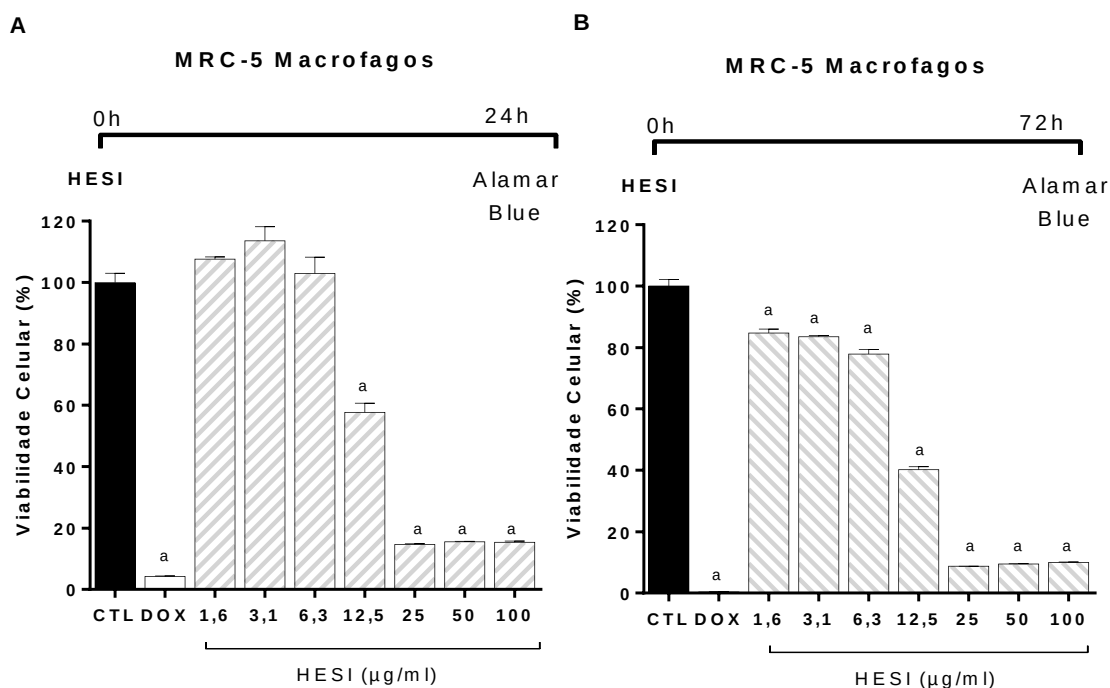


Figura 13: A viabilidade celular foi testada em diferentes concentrações do extrato hexânico (EHSI) durante 24 e 72 horas em a linhagem celular MRC-5 mediante o método de Alamar Blue e os resultados foram expressos em Média ± SEM e triplicata do percentual de células viáveis. One-way ANOVA com o teste Dunnet foi aplicado. Onde: $p < 0,0001$ (a) é significante, quando comparado ao controle (CTL).

5.5 Testes *in vivo*

5.5.1 *Análise da Toxidade*

Para o teste de toxidade considerou-se o experimento sugerido pela OECD 423 (2001). Foram utilizados 3 camundongos machos, que receberam uma dose de 2000 mg/kg em 5 doses fraccionadas do EHSI de 400 mg/kg com intervalo de 10 minutos. Os animais ficaram em observação constante as primeiras 12 horas e depois continuaram sobre observação por 14 dias. No final do experimento os 3 camundongos apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%. Por essa razão foi relatado que não houve toxidade na administração da dose de 2000 mg/kg.

5.5.2 *Efeitos do extrato hexânico no teste oral de tolerância a Glicose (TOTG)*

No ensaio *in vivo* o EHSI foi capaz de reduzir a glicemia em animais normais após receber uma sobrecarga de glicose como é mostrado na figura 14. Nos resultados do TOTG foram observados que antes da administração da glicose no tempo 0 min, não houve diferença significativa nos níveis de glicose entre os grupos, $p=0,1937$. Porém, ao se administrar a Glicose por gavagem, e mensurar a glicemia aos 15 minutos observou-se um aumento nos grupos: CTL ($331,7 \pm 62,6$ mg/dL), grupo padrão METF300 ($269,8 \pm 67,3$ mg/dL), grupo EHSI100 mg/kg ($195,6 \pm 68,5$ mg/dL) e EHSI50 mg/kg ($129,1 \pm 59,2$).

Ao medir a glicemia aos 30 min após a gavagem observou-se o máximo aumento em todos os grupos: CTL ($383,3 \pm 41,3$ mg/dL), grupo padrão METF300 ($323,3 \pm 45$ mg/dL), grupo EHSI100 mg/kg (260 ± 46 mg/dL) e EHSI50 mg/kg ($305,8 \pm 59,4$).

Ao medir a glicemia aos 60 minutos após a gavagem observou-se que o grupo CTL com uma glicemia de $182,2 \pm 28$ mg/dL, foi o único que não regrediu na sua glicemia basal. No tempo de 90 min após a gavagem todos os grupos voltaram para a glicemia basal ou glicemia de tempo 0.

Neste ensaio podemos perceber que os grupos HESI100, HESI50 e METF300 foram capazes de reduzir as concentrações de glicose, quando comparados ao grupo CTL nos tempos de 15, 30 e 60 minutos. Na análise estatística por Two-way ANOVA de dunnett demonstrou diferença significativa no teste ao serem comparados com o CTL.

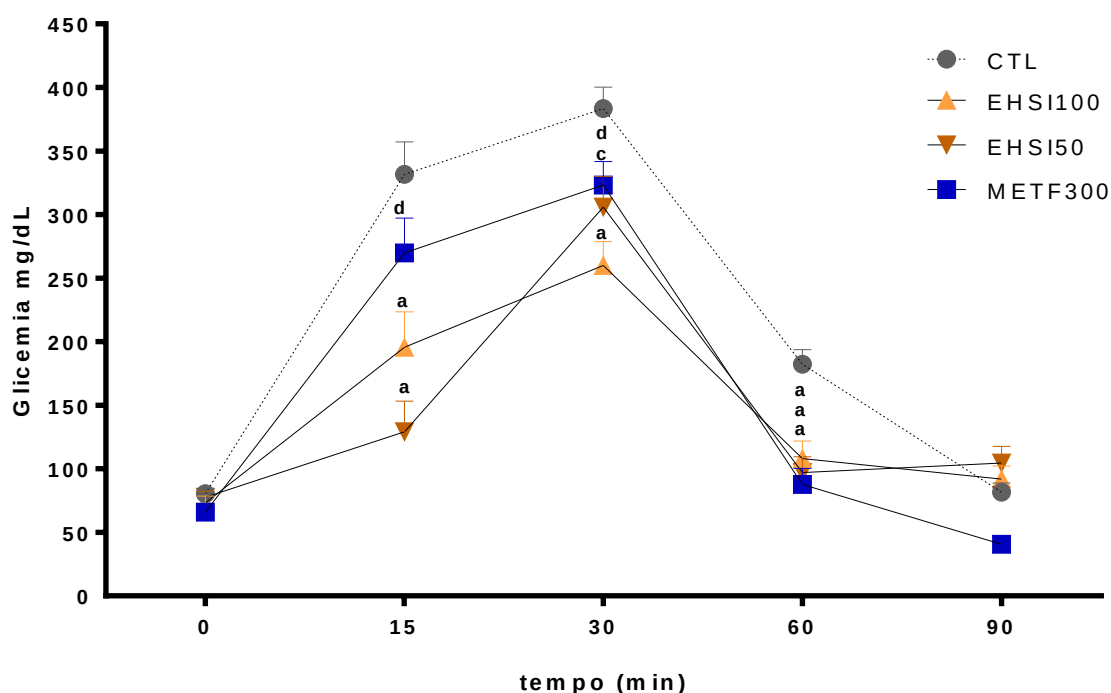


Figura 14: Teste de tolerância oral à glicose (TTOG) em camundongos normais. Os grupos controle (CTL), hexânico 100 mg/kg (EHSI100), hexânico 50 mg/kg (EHSI50) e metformina 300 mg/kg (METF300) foram tratados com uma sobrecarga de glicose por via oral e a glicemia plasmática foi medido em um período de tempo em minutos. Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM para (n = 6). Two way ANOVA com teste Dunnett foi aplicado. Onde: $p < 0,0001$ (a), $p < 0,001$ (b), $p < 0,01$ (c), $p < 0,05$ (d) mostra diferença estatística significante, quando comparado ao Grupo Controle (CTL).

5.4.3 Efeito do extrato hexânico de *S. impressifolia* em camundongos diabéticos

Os resultados do efeito do EHSI sobre a glicemia de camundongos diabéticos estão representados na Figura 15

No dia 0 foi mesurada a glicemia dos grupos NG ($87,8 \pm 6,3$ mg/dL), CTL ($300,6 \pm 20,2$ mg/dL), METF300 ($291,4 \pm 25,7$ mg/dL), EHSI50 ($280,8 \pm 23,1$ mg/dL) e HESI100 ($274,2 \pm 19,6$ mg/dL). No quinto dia de tratamento o grupo NG apresentou um leve aumento na glicemia de $87,8 \pm 6,3$ mg/dL para $101 \pm 7,5$ mg/dL. Os grupos restantes apresentaram aumento na glicemia ao comparar o dia zero ao quinto dia, o grupo CTL de $300,6 \pm 20,2$ mg/dL para $448 \pm 42,3$ mg/dL; o grupo METF300 de $291,4 \pm 25,7$ para $369,8 \pm 96,3$ mg/dL; o EHSI50 de $280,8 \pm 23,1$ mg/dL para $358,2 \pm 33,1$ mg/dL; e o grupo HESI100 de $274,2 \pm 19,6$ mg/dL para $364,8 \pm 33,8$ mg/dL, respectivamente.

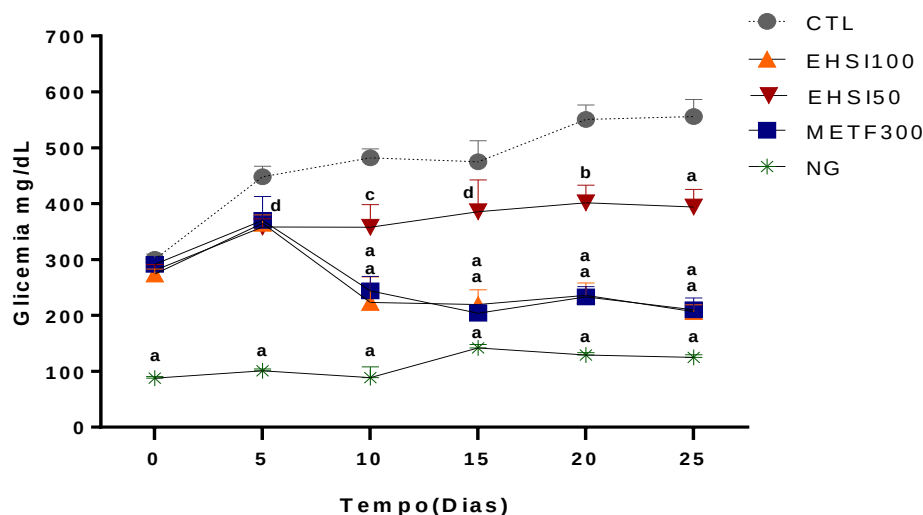


Figura 15: No teste crônico (B), vemos o efeito da administração do EHSI na glicemia dos camundongos diabéticos em um período de tempo em dias. O diabetes foi induzido por dieta hipercalórica e por aplicação de estreptozotocina por 7 dias, os camundongos com glicemia superior a 250 mg/dL foram separados e em grupos: Normoglicêmicos (NG), controle (CTL), metformina (METF300) e os grupos testes (EHSI50 e EHSI100). Os grupos NG e CTL foram tratados com 200µL de veículo (Soro fisiológico + Kolliphor 3%) Os valores foram expressos em média $\pm$ SEM para (n = 5). Two way ANOVA com teste Dunnet foi aplicado. Onde: $p < 0,0001$ (a), $p < 0,001$ (b), $p < 0,01$ (c), $p < 0,05$ (d) mostra diferença estatística significativa, quando comparado ao Grupo Controle (CTL).

No décimo dia de tratamento, o grupo NG apresentou diminuição da glicemia em comparação ao quinto dia, de $101 \pm 7,5$ mg/dL para $88,6 \pm 43,1$ mg/dL, o grupo CTL aumento de $448 \pm 42,3$ mg/dL para $482 \pm 35,7$ mg/dL, o grupo METF300 diminuiu de $369,8 \pm 96,3$ mg/dL para $243,8 \pm 58,2$ mg/dL, o grupo HESI50 diminuiu de $358,2 \pm 33,1$ mg/dL para $357,6 \pm 90,7$ mg/dL e o grupo HESI100 diminuiu de $364,8 \pm 33,8$ mg/dL para $223 \pm 102,3$ mg/dL.

No 25º e último dia de tratamento os NG apresentaram diminuição da glicemia comparado ao dia 20º de $129,2 \pm 9,7$ mg/dL para $125 \pm 10,2$ mg/dL, o grupo CTL aumentou de $550,8 \pm 57,9$ mg/dL para $555,6 \pm 68,5$ mg/dL, o grupo METF300 diminuiu de $233,2 \pm 40,5$ mg/dL para $210 \pm 47,4$ mg/dL, grupo HESI50 diminuiu de $401,6 \pm 69,8$ mg/dL para $394,2 \pm 69,6$ mg/dL e o grupo HESI100 diminuiu de $236 \pm 48,9$ mg/dL para $206,8 \pm 27,1$ mg/dL.

No final do tratamento observou-se que o padrão Metformina 300 mg/kg manteve a glicemia baixa ($210 \pm 47,4$ mg/dL) igualmente ao extrato hexânico da Salacia na dose de 100 mg/kg ($206,8 \pm 27,1$ mg/dL) e na dose de 50 mg/kg também foi capaz de diminuir a glicemia ($394,2 \pm 69,6$ mg/dL). Estes resultados mostram significância estatística de $p < 0,0001$ no ANOVA, quando comparados com o Grupo Controle tratado com o veículo

5.5.4 Dosagens bioquímicas

Tabela 03: Os resultados bioquímicos dos grupos Normoglicêmicos (NG), Metformina 300 mg/kg (METF300), Salacia 100mg/kg (EHSI100) e Salacia 50mg/kg (EHSI50) são expressos em média $\pm$ DP (N=6/Grupo) e analisados por One-way ANOVA seguido por Dunnett, onde $p < 0,0001$ (a), $p < 0,001$ (b), $p < 0,01$ (c) e $p < 0,05$ (d), mostrando uma diferença estatística significativa ao serem comparados com o grupo Controle (CTL).

	NG	CTL	METF300	EHSI100	EHSI50
Glicose (mg/dL)	125 $\pm$ 10,2 ^a	555,6 $\pm$ 68,5	210 $\pm$ 47,4 ^a	206,8 $\pm$ 27,1 ^a	394,2 $\pm$ 69,6 ^b
Insulina (μ IU/mL)	15,6 $\pm$ 4,8	18 $\pm$ 1,7	16,6 $\pm$ 4,7	11,1 $\pm$ 2,6 ^d	12,9 $\pm$ 3,4
HbA1c (%)	4,4 $\pm$ 0,3 ^a	7,3 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 1	6,9 $\pm$ 0,9
CML (mg/dL)	7,4 $\pm$ 1,2 ^d	10,5 $\pm$ 2,1	9,5 $\pm$ 0,8	8,1 $\pm$ 1,5	9,7 $\pm$ 0,8
Colesterol (mg/dL)	83,88 $\pm$ 11	97 $\pm$ 15	101 $\pm$ 16	92 $\pm$ 5	93 $\pm$ 3
Triglicerídeos (mg/dL)	94,9 $\pm$ 14,6 ^b	189,4 $\pm$ 26,9	143,8 $\pm$ 33,4 ^c	144,4 $\pm$ 46,5 ^c	115,9 $\pm$ 49,3 ^d
HDL-c (mg/dL)	58 $\pm$ 12	52 $\pm$ 12	62 $\pm$ 16	74 $\pm$ 15	61 $\pm$ 10
Ac. Úrico (mg/dL)	3,8 $\pm$ 2,2 ^c	9,2 $\pm$ 2,3	5,8 $\pm$ 2	5,4 $\pm$ 2,8	7,3 $\pm$ 2,7
Creatinina (mg/dL)	0,32 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,6 ^d	1,28 $\pm$ 0,4 ^d	0,98 $\pm$ 0,7
Ureia (mg/dL)	25 $\pm$ 12	49 $\pm$ 17	46 $\pm$ 19	32 $\pm$ 5	79 $\pm$ 39
TGO (U/L)	49 $\pm$ 18	58 $\pm$ 15	58 $\pm$ 28	26 $\pm$ 5	32 $\pm$ 17 ^d
TGP (U/L)	9 $\pm$ 2 ^d	52 $\pm$ 31	47 $\pm$ 11	46 $\pm$ 26	32 $\pm$ 10

Os resultados das dosagens bioquímicas dos grupos tratados com o extrato hexânico estão representados na Tabela 03. No perfil glicêmico observou-se que o EHSI100 quando comparado ao CTL mostra diminuição da glicemia (mg/dL) de 555,6 $\pm$ 68,5 para 206,8 $\pm$ 27,1 ($p < 0,0001$) e na insulina (μ IU/mL) de 18 $\pm$ 4,9 para 11,1 $\pm$ 2,6 ($p < 0,05$). No perfil lipídico observou-se também a diminuição dos triglicerídeos (mg/dL) de 189,4 $\pm$ 26,9 para 144,4 $\pm$ 46,5 mostrando diferença significativa de $p < 0,01$. No perfil hepático e renal apresentou diminuição dos níveis de transaminases, TGO (U/L) de 58 $\pm$ 15 para 26 $\pm$ 5 ($p < 0,05$) e aumento da creatinina (mg/dL) de 0,3 $\pm$ 0,1 para 1,28 $\pm$ 0,4 ($p < 0,05$).

Em comparação o EHSI50 quando comparado ao grupo CTL também conseguiu diminuir a glicemia de $555,6 \pm 68,5$ para $494,2 \pm 69,6$ ($p < 0,001$) e os triglicerídeos de $198,4 \pm 26,9$ ($p < 0,001$) para $115,9 \pm 49,3$ ($p < 0,001$).

6. DISCUSSÃO

O estudo teve como objetivo avaliar a atividade antidiabética de extratos das cascas de *S. impressifolia* em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro*, bem como identificar e descrever os compostos maioritários encontrados no extrato mais ativo para poder justificar suas propriedades biológicas. Isso porque, a *S. impressifolia* conhecida popularmente como cipó-miraruíra é usada tradicionalmente para o tratamento do diabetes e como medicamento anti-inflamatório na medicina folclórica Brasileira (ALMEIDA, 1993).

O extrato hexânico foi caracterizado por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Este extrato apresentou 4 compostos maioritários que são a tingenona, 22 β -hidroxitingenona, priestimerina e 30-hidroxipriestimerina e também apresenta compostos minoritários como a misturas de α e β amirina que são mostrados por Silva (2016). Vale destacar, que os compostos obtidos pela maceração em hexano mostram um perfil fitoquímico diferente aos obtidos em etanol-água e metanol mostrando triterpenos como compostos majoritários e poucos compostos fenólicos.

Prabhakar, (2017) nos diz que a mistura de α e β amirinas tem efeito hipoglicemiante por diminuir a absorção de carboidratos *in vivo*, diminuir a glicemia em ratos e camundongos diabéticos, inibir a enzima α -amilase, α -glucosidase e lipase *in vitro*.

Pode-se observar que entre os extratos com maior atividade antioxidante, tanto para o radical DPPH $^{\bullet}$ como para ABTS $^{\bullet}$, o EMSI teve maior atividade antioxidante com CI_{50} em

$\mu\text{g/mL}$ de $17,05 \pm 0,32$ (DPPH $^{\bullet}$) e o EhSI com CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ $3,76 \pm 0,32$ (ABTS $^{\bullet}$), o extrato que teve a menor atividade foi o EHSI com CI_{50} de $125,12 \pm 1,85$ (DPPH $^{\bullet}$) e $97,55 \pm 3,54$ (ABTS $^{\bullet}$). Pode-se observar que a atividade antioxidante está diretamente ligada à concentração de compostos fenólicos encontradas nos extratos, sendo diretamente proporcional a polaridade do solvente utilizado para sua extração. Ruani (2014), relata que o extrato etanólico da casca do caule de *S. impressifolia* obteve um porcentual de inibição para radical DPPH $^{\bullet}$ de $92,98 \pm 0,28$ e as frações obtidas deste extrato também compartilham esta atividade. Este estudo corrobora o nosso resultado e mostra que a *S. impressifolia* possui uma forte atividade antioxidante com os extratos hidroetanólico e metanólico.

Para os ensaios inibitórios de enzimas digestivas *in vitro*, os EHSI (CI_{50} de $13,03 \pm 0,7$ $\mu\text{g/mL}$) e EASI (CI_{50} de $7,6 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$) mostraram atividade contra a enzima lipase, este resultado é compartilhado com Yoshikawa (2002) e Malar (2018) onde nós é mostrado que a *S. oblonga* diminui a absorção de lipídeos por inibição da lipase e que o extrato aquoso de *S. reticulata* coletados no oeste da Índia, age em altas concentrações com IC_{50} de $73,6$ mg/mL ficando muito distante do padrão acarbose com IC_{50} de $58,2$ $\mu\text{g/mL}$. Mas Yoshino (2009) nos mostra um cenário diferente ao inibir a α -glucosidase a baixa concentração com o extrato aquoso de *S. reticulata* ($\text{IC}_{50} = 31$ $\mu\text{g/mL}$), Yoshikahua (2003) reforça este resultado ao conseguir inibir a atividade da enzima α -glucosidase com os extratos etanol-agua (4:1) de *S. chinensis* ($\text{IC}_{50} = 133$ $\mu\text{g/mL}$), *S. oblonga* ($\text{IC}_{50} = 64$ $\mu\text{g/mL}$) e *S. reticulata* ($\text{IC}_{50} = 87$ $\mu\text{g/mL}$) oriundos do Japão, estes mesmos extratos mostrarão atividade específica contra as enzimas sacarase e maltose a baixas concentrações *in vitro*. Segundo estes resultados podemos apreciar que a atividade biológica da Salacia muda de um país para outro, isto acontece por que o perfil fitoquímico muda por vários fatores como o clima, época do ano, altura e composição do solo.

A glicação é um processo irreversível muito comum no paciente diabético que leva a serias complicações por que afeita diretamente a atividade das proteínas, por esse motivo os antiglicantes podem contribuir muito no tratamento do diabetes. Neste estudo podemos mostrar que nos ensaios antiglicantes *in vitro* o EHSI inibiu tanto a via oxidativa com CI_{50} de $28,7 \pm 1 \mu\text{g/mL}$, como a via não oxidativa com CI_{50} de $19,6 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$. Estes resultados mostram ser promissórios ao ter CI_{50} menores que os padrões usados em ambas vias: quercetina - via oxidativa e aminoguanidina - via não oxidativa, com CI_{50} de $35,6 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ e $28,6 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$.

Este efeito também foi mostrado por Da Luz, (2016). que usou o extrato etanólico de *S. impressifolia* e as frações aquosa, acetato de etila e clorofórmio obtidas do extrato etanólico nas concentrações de 2,5 e 5 $\mu\text{g/mL}$ onde mostrou *in vitro* a inibição da formação dos AGEs pela via não oxidativa com albumina-frutose ao diminuir a fluorescência no 28º dia de incubação. Também foi usada a glicose com a albumina, para corroborar este resultado, onde o extrato etanólico e suas frações inibiram significativamente a formação de AGEs no 14º dia de incubação. O resultado apresentado por Da Luz (2016) possui uma limitação ao não ser apresentado em porcentual de inibição ou por CI_{50} , pelo qual é difícil quantificar a ação do extrato etanólico bruto, porém mostra que apresenta atividade antiglicante e o presente trabalho complementa e ratifica os achados realizados por Da Luz (2016).

Pelos resultados até agora encontrados o melhor extrato para a caracterização química, teste celular e testes *in vivo* foi o extrato hexânico (EHSI), por ter mostrado significativa atividade antiglicante em ambas as vias (oxidativa e não oxidativa) e ao não mostrar uma boa atividade antioxidante nos diz que o efeito contra o glioxal é especificamente antiglicante e não por suas propriedades antioxidantes. Outro ponto que justifica sua escolha é porque já foram realizados trabalhos (Da Luz, 2016; Merlini, 2015; Ruani, 2014), para o tratamento do diabetes

com extratos etanólico e hidroetanólico das cascas de *S. impressifolia*. O extrato acetato também mostrou ter um bom potencial para o tratamento da diabetes, porém nos vemos limitados a realizar os ensaios *in vivo* só com um extrato pelo CEUA, espera-se que próximos trabalhos sejam realizados no futuro com o extrato acetato de etila (EASI).

A avaliação da toxicidade do extrato hexânico de *S. impressifolia*, foi realizado pelo teste de viabilidade celular, que apresentou baixa toxicidade entre as 24 e 72 horas e pelo teste de toxicidade aguda *in vivo* não mostrou óbito na dose de 2000mg/kg. Por essa razão foi relatado que a doses letal media (DL₅₀) encontrasse na categoria 5 (> 2000 – 5000) do GHS, sendo não toxica por mais que no ensaio de viabilidade celular mostrou uma leve toxicidade. Nosso resultado foi semelhante ao achado por Godwin (2018) ao administrar por via oral o extrato metanólico de *S. lehmbachii* na concentração de 5000 mg/kg e não mostrou sinais de toxicidade nem letalidade após 15 dias do tratamento. Por esse motivo foram selecionamos as concentrações de 50 e 100 mg/kg para a próxima etapa com os experimentos de teste de tolerância oral a glicose (TTOG) e o teste crônico com camundongos diabéticos.

Para avaliar se o EHSI aumenta a captação de glicose pelas células dos órgãos *in vivo*, foi realizado o TTOG. No teste agudo, podemos perceber que os grupos tratados com 100 mg/kg de EHSI (EHSI100), 50 mg/kg de EHSI (EHSI50) e 300 mg/Kg de metformina (METF300) foram capazes de reduzir os níveis de glicose nos tempos de 15, 30 e 60 minutos quando comparados ao grupo trado com salina (CTL) como mostra a figura 14. Não foram realizados os testes de tolerância oral a dissacarídeos (maltose e sacarase) e a carboidratos (amilase) por que o produto final destes ensaios é a glicose, também por que não apresentou

atividade inibitória maior de 50% da enzima α -glucosidase *in vitro* na concentração de 100 μ g/ml.

Este resultado termino sendo contrário à os achados por Williams (2007), onde mostra que o extrato hidroetanólico de *S. oblonga* melhorou a tolerância a carboidratos em pacientes com DM2 e os extratos de *S. chinensis*, *S. oblonga*, *S. reticulata* nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/kg testados por Yoshikawa (2003) em ratos, mostrou ter atividade inibitória *in vivo* contra as enzimas maltase e sacarase, mas não diminuiu a glicemia plasmática no TTOG o que mostra que o principal mecanismo de ação é a inibição enzimática, muito diferente a os achados neste estudo com EHSI.

No ensaio crônico, o EHSI diminuiu a glicemia dos camundongos diabéticos tratados nas concentrações de 100 e 50 mg/kg por 25 dias quando comparados com os diabéticos não tratados. Resultado similar foi encontrado por Merlin (2015) com o extrato hidroetanólico de *S. impressifolia* na concentração de 200mg/kg. Os achados de Bhat (2012) mostraram que extrato hidroetanólico de *S. oblonga* (SOE) em doses de 50 e 100 mg/kg diminui significativamente a glicose sanguínea e da HbA1c com um aumento dos níveis de insulina sérica.

O melhor resultado dos parâmetros bioquímicos no teste crônico em camundongos diabéticos foi na maior concentração de 100 mg/kg, com um melhoramento do perfil glicêmico (glicose e insulina), perfil lipídico (triglicerídeos) e perfil Hepático (TGO). No perfil renal, a creatinina aumentou mostrando uma possível inflamação renal. Estes resultados são similares aos encontrados por Morikawa (2015), que utilizou camundongos tratados com *S. chinensis* e

Bhat (2012), que utilizou ratos tratados com *S. Oblonga* e nos camundongos Balb/c tratados com extrato hidroetanólico de *S. impressifolia* por Merlin (2015). Os triglicerídeos apresentaram concentrações maiores que o colesterol em todos os grupos, este fenômeno é explicado uma vez que, segundo a literatura para a linhagem de camundongos albinos Balb/c este perfil já é esperado (WIRTH-DZIECIOŁOWSKA, 2009)

Neste trabalho podemos observar que o EHSI mostrou ter uma considerável atividade antiglicante ao atuar pela via oxidativa e não oxidativa *in vitro*, e no resultado *in vivo* podemos observar o possível efeito antiglicante por diminuição da HbA1c e CML, mas não mostrarão ser estatisticamente diferentes ao grupo CTL, isto pode ter acontecido por que o período de 25 dias de tratamento não conseguiu ser o suficiente para que os marcadores obtenham uma diferencia estatística aceitável. Este problema foi observado por GM Campbell, 2016 (PMID: 27497735) onde nos diz que é preciso de mais de 12 semanas de tratamento para poder detectar a glicação não enzimática do colágeno em ossos de ratos diabéticos e Shirakawa 2016 conseguiu demonstrar a diminuição da CML no osso de ratos diabéticos tratados com extrato aquoso de *S. chineses* com 20 semanas de tratamento.

O achado da priestimerina como um dos compostos majoritários nos induz a pensar que o EHSI também poderia apresentar atividade anti-inflamatória o que potencializaria ainda, mas seu efeito antidiabético. Estudos posteriores poderão ser realizados para responder esta questão.

7. CONCLUSÃO:

Entre os extratos obtidos por maceração das cascas de *Salacia impressifolia* em etanol:água, metanol, acetato de etila e hexano, o extrato mais ativo foi aquele obtido por maceração em hexano. Os compostos majoritários encontrados neste extrato foram a Pristimerina e a Tingenona.

O extrato hexânico não apresentou propriedades inibitórias sobre a enzima α -glucosidase, e sobre os radicais DPPH[•] e ABTS[•], mostrando ser eficaz na inibição da lipase intestinal e mostrou-se ativo como agente antiglicante nas vias oxidativa e não oxidativa. O extrato hexânico, não apresentou óbito na toxicidade aguda em camundongos até a dose de 2000 mg/kg de peso, contudo mostrou-se tóxico para macrófagos murinos na concentração de 12,25 µg/mL até 72 horas após o tratamento.

O EHSI apresentou um efeito hipoglicemiante *in vivo* no teste crônico de 25 dias em camundongos diabéticos e como consequência melhorou o perfil glicêmico ao diminuir a concentração de glicose e insulina plasmática, o perfil lipídico ao diminuir a concentração de triglicerídeos e o perfil hepático ao diminuir as transaminases. Estes resultados podem ser vinculados a inibição da enzima lipase, já que o diabetes e a obesidade estão ligados, também pode ser vinculado ao aumento da captação de glicose *in vivo* como foi mostrado no TTOG e no teste crônico com diminuição da insulina.

In vitro o HESI mostrou ter atividade antiglicante significativa, mas não foi possível avaliar esta atividade *in vivo*, por que o tempo de 25 dias de tratamento foi insuficiente para avaliar a CML e HbA1c, sugerindo 20 semanas de tratamento para poder ter uma diferença estatística significativa com o CTL. Com base a estes resultados obtidos pode-se propor que o extrato hexânico das cascas de *Salacia impressifolia* apresenta propriedades antidiabéticas, e

mais pesquisas devem ser realizadas para que possa ser usado como um fitoterápico para o tratamento da diabetes,

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASE, T. et al. Preventive Effects of *Salacia reticulata* on Obesity and Metabolic Disorders in TSOD Mice. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011.

AKUODOR, G. C. et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of ethanol extract of *Salacia lehmbachii* stem bark in alloxan-induced diabetic rats. **J Basic Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 2, p. 239-244. ISSN 2191-0286. Oct 2018

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus Editora. 341p. 1993.

ANDRADE, C. A.; BECERRA, J. J.; CÁRDENAS, V. R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, Feb 2008.

ARNOLD, S. E. et al. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 67, p. 79-87, Jul 2014

ASHRAF, J. M.; SHAHAB, U.; TABREZ, S.; LEE, E. J.; CHOI, I.; AHMAD, S. Quercetin as a finer substitute to aminoguanidine in the inhibition of glycation products. **International journal of biological macromolecules**, v. 77, p. 188-92, 2015.

AYURVEDIC MEDICINAL PLANTS. *Salacia impressifolia*, **Taxonomy**. Disponível em: <<http://ayurvedicmedicinalplants.com/plants/4502.html>>. Acesso em: Mar 2018.

BASU, S.; PANT, M.; RACHANA, R. Protective effect of *Salacia oblonga* against tobacco smoke-induced DNA damage and cellular changes in pancreatic β -cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 3, p. 458-64, 2016.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 3ª edição. 2011. 680p.

BHAT, B. M.; C, V. R.; D'SOUZA, V.; MANJREKAR, P. A. Antidiabetic and hypolipidemic effect of *Salacia oblonga* in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, n. 10, p. 1685-7, Dec 2012.

BIERHAUS, A.; HOFMANN, M. A.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586-600, Mar 1998.

BISHOP, M. L.; FODY, E. P. **QUÍMICA CLÍNICA**; Principios, procedimientos y correlaciones. 5ta. 750p. 2007.

BOLETIM DO TORREY BOTANICAL CLUB. *Salacia impressifolia* (Miers) AC Sm. Flora de Nicaragua. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/name/15600175?projectid=7>>. Acesso em: Mar 2018

BURITS, M.; BUCAR, F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. **Phytotherapy research**, v. 14, n. 5, p. 323-8, Aug 2000.

BUTTERFIELD, D. A.; DI DOMENICO, F.; BARONE, E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: a key role for oxidative stress in brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 9, p. 1693-706, Sep 2014.

CALDAS, R. W.; CARNEIRO, C. M. Estudo Fitoquímico de *Salacia impressifolia* (Miers). AC Smith. HIPPOCRATEACEAE. **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Livro de Resumos. May 2000.

CAMPBELL, G. M. et al. Effects of insulin therapy on porosity, non-enzymatic glycation and mechanical competence in the bone of rats with type 2 diabetes mellitus. *Bone*, v. 91, p. 186-93. ISSN 1873-2763. Oct 2016.

CHAMPE., P. C.; HARVEY., R. A.; DENISE R. FERRIER. Bioquímica Ilustrada. 3ra edição. **Artmed Editora SA**, 2006.

COSTA, N. L. S.; RIPARDO, H. S. F.; SANTOS, J. C. L.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Triterpenos oleano e ursano do caule de *Salacia impressifolia* (HIPPOCRATEACEAE). **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Livro de Resumos. May 2006.

CRUZ, H. J.; LICEA, P. M. E.; HERNÁNDEZ, G. P.; ABRAHAM M. E. A.; YANES Q. M. Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus: **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**. 58 (2): 102-107 p. 2011.

DAGOGO, J. S. 2015 Presidential Address: 75 Years of Battling Diabetes--Our Global Challenge. **Diabetes Care**, v. 39, n. 1, p. 3-9. ISSN 1935-5548. Jan 2016

Da LUZ, M. G. **Estudo da atividade biológica de *Salacia impressifolia*, *Croton heterodoxus* e triterpenos na homeostasia da glicose em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro***. Dissertação (Doutora em Bioquímica). Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

DÍAZ, A. D. Hiperglicemia y estrés oxidativo en el paciente diabético: **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**. 25: 1-7 p. 2006

DUARTE, A. I. et al. Crosstalk between diabetes and brain: glucagon-like peptide-1 mimetics as a promising therapy against neurodegeneration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1832, n. 4, p. 527-41, Apr 2013.

GILLERY, P. [Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes]. **Journal de la Société de biologie**, v. 195, n. 4, p. 387-90. ISSN 1295-0661. 2001.

HARTOG, J. W.; VOORS, A. A.; BAKKER, S. J.; SMIT, A. J.; VAN VELDHUISEN, D. J. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. **European Journal Heart Failure**, v. 9, n. 12, p. 1146-55, Dec 2007.

IDF, 2015. International Diabetes Federation. IDF Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2015.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420-32. ISSN 0149-5992. Jun 2006.

JURANEK, J.; RAY, R.; BANACH, M.; RAI, V. Receptor for advanced glycation end-products in neurodegenerative diseases. **Reviews in the Neurosciences**, v. 26, n. 6, p. 691-8. 2015.

KARAMAN, A.; AYDIN, H.; GEÇKINLI, B.; ÇETINKAYA, A.; KARAMAN, S. DNA damage is increased in lymphocytes of patients with metabolic syndrome. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 782, p. 30-5, Apr 2015.

KIERDORF, K.; FRITZ, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. **Journal Leukocyte Biology**, v. 94, n. 1, p. 55-68, Jul 2013a.

KIHO, T.; USUI, S.; HIRANO, K.; AIZAWA, K.; INAKUMA, T. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200-5, Jan 2004. >.

KIM, H. J.; PARK, G. M.; KIM, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 4, p:495-500. Abr 2013.

KUMAR, S.; KUMAR, D.; JUSHA, M.; SAROHA, K. SINGH, N.; VASHISHTA, B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, n. 2, p. 215-20, Jun 2008.

KURIAN, G. A.; MANJUSHA, V.; NAIR, S. S.; VARGHESE, T.; PADIKKALA, J. Short-term effect of G-400, polyherbal formulation in the management of hyperglycemia and hyperlipidemia conditions in patients with type 2 diabetes mellitus. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1158-64, Oct 2014.

KUSHWAHA, P. S.; SINGH, A. K.; KESHARI, A. K.; MAITY, S.; SAHA, S. An Updated Review on the Phytochemistry, Pharmacology, and Clinical Trials of *Salacia oblonga*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 109-114, 2016 Jul-Dec 2016.

LIU, Y.; GAO, X.; DEEB, D.; ZHANG, Y.; SHAW, J.; GAUTAM, S. C. Anticancer agent pristimerin inhibits IL-2 induced activation of T lymphocytes. **Journal of experimental therapeutics & oncology**, V. 11, n. 3, p 181-188. Jul 2016B.

MALAR, G.; C., C. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of ethanol extract of *Salacia lehmbachii* stem bark in alloxan induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 54, n. 1. ISSN 2175-9790. 2018.

MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.; YASHIRO, K.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. IV. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from the roots of *Salacia oblonga* Wall. (Celastraceae): structure of a new friedelane-type triterpene, kotalagenin 16-acetate. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 47, n. 12, p. 1725-9, Dec 1999.

McKEE, T.; McKEE, J. R. Bioquímica a Base Molecular da Vida 3ra. 773p. 2003

MERLIN L. M. **Avaliação dos Principais Metabólitos Secundários por Espectrometria de Massas e Atividade Hipoglicêmica de *Salacia impressifolia* Miers A. C.Smit.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de Caxias do Sul. 2015.

MESQUITA J. D.; PEREIRA, A. J. A.; MELO, C. W. Proteína do grupo 1 de mobilidade alta (HMGB-1): função imune e utilização como marcador diagnóstico. **Estudos**, Goiânia, v. 41, n. 4, p. 821-830, out./dez. 2014.

MIRHASHEMI, S. M. et al. Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Inflammatory Cytokines and Advanced Glycation End Products in Patients With Diabetic Nephropathy: a Randomized Controlled Trial. **Iran J Kidney Dis**, v. 10, n. 4, p. 197-204. ISSN 1735-8604. Jul 2016.

MOHAN, S.; ESKANDARI, R.; PINTO, B. M. Naturally occurring sulfonium-ion glucosidase inhibitors and their derivatives: a promising class of potential antidiabetic agents. **Accounts of Chemical Research**, v. 47, n. 1, p. 211-25, Jan 2014.

MORIKAWA, T. et al. Salacinol and related analogs: new leads for type 2 diabetes therapeutic candidates from the Thai traditional natural medicine *Salacia chinensis*. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1480-93, Feb 2015.

MOTTA, V. T. **BIOQUÍMICA BÁSICA**. 2da edição. 448 ISBN 9788599977668. 2011

NAKAYAMA, G. R. et al. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **J Immunol Methods**, v. 204, n. 2, p. 205-8, May 1997.

NCD-RISC. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1513-30, Apr 2016.

NEELOFAR, K. M.; AHMAD, J.; ARIF, Z.; ALAM, K. Elucidating the impact of glucosylation on human serum albumin: A multi-technique approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 881-891, Aug 2016.

OECD. Test no. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **Paris: OECD Publishing**, 2001.

PRABHAKAR, P.; REETA, K. H.; MAULIK, S. K.; DINDA, A. K.; GUPTA, Y. K. α -Amyrin attenuates high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. **Applied physiology, nutrition, and metabolism**, v. 42, n. 1, p. 23-32, Jan 2017.

REFLORA. *Salacia impressifolia* (Miers) A.C.Sm. Flora do Brasil 2020. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB22429&action=print>>. Acesso em: Mar 2018.

RIPARDO, H. S. F.; COSTA, N. L. S.; FERREIRA, L. C. O.; MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S. Outros triterpenos do caule de *Salacia impressifolia* (Hippocrateaceae). **31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Livro de Resumos. May 2007

RUANI, A. **Investigação fitoquímica e biológica da espécie vegetal *Salacia impressifolia***. Dissertação (Mestrado em Química, Área de concentração Química Orgânica). Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

SELLAMUTHU, P. S.; ARULSELVAN, P.; MUNIAPPAN, B. P.; FAKURAZI, S.; KANDASAMY, M. Mangiferin from *Salacia chinensis* prevents oxidative stress and protects pancreatic β -cells in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Food**. v, 16, n, 8. p. 719-727. Aug 2013

SELLAMUTHU, P. S.; ARULSELVAN, P.; FAKURAZI, S.; KANDASAMY, M. Beneficial effects of Mangiferin isolated from *Salacia chinensis* on biochemical and hematological parameters in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 161-7, Jan 2014.

SHAKTHI, D. A.; SATHISH, K. T.; KUMARESAN, K.; RAPHEAL, V. S. Extraction process optimization of polyphenols from Indian *Citrus sinensis* - as novel antiglycative agents in the management of diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 1, p. 11, Jan 2014.

SHANTY, A.; MOHANAN, P. Heterocyclic Schiff bases as non toxic antioxidants: Solvent effect, structure activity relationship and mechanism of action. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 192, p. 181-187, Nov 2017

SHIMADA, T. et al. *Salacia reticulata* inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 1, p. 67-74, Jun 2011.

SHIRAKAWA, J. et al. *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats. **Food & Function**, v. 7, n. 6, p. 2508-15, Jun 2016.

SIDDIQUI, M. A. et al. In-Vitro dual inhibition of protein glycation, and oxidation by some Arabian plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 276, Aug 2016.

SILVA, F. M. A. et al. Chemical constituents from *Salacia impressifolia* (Miers) A. C. Smith collected at the Amazon rainforest. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 68, p. 77-80. Oct 2016

SINGH, R. G.; RATHORE, S. S.; WANI, I. A.; USHA; AGRAWAL, A.; DUBEY, G. P. Effects of *Salacia oblonga* on cardiovascular risk factors in chronic kidney disease patients: a

prospective study. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 26, n. 1, p. 61-6, Jan 2015.

SLANC, P.; DOLJAK, B.; KREFT, S.; LUNDER, M.; JANES, D. STRUKELJ, B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. **Phytother. Res.** 2009, v.23, 874–877.

SUN, J. et al. Hypoglycemic effect and mechanism of honokiol on type 2 diabetic mice. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 9, p. 6327-42. 2015.

SZEREMETA, M. et al. [The relations between platelet count, mean platelet volume and HbA1C in patients with type 2 diabetes]. **Przegląd Lekarski**, v. 66, n. 12, p. 1049-51. ISSN 0033-2240. 2009.

THORNALLEY, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 31-40, Nov 2003.

VISTOLI, G.; DE MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47 Suppl 1, p. 3-27, Aug 2013.

WILLIAMS, J. A.; CHOE, Y. S.; NOSS, M. J.; BAUMGARTNER, C. J.; MUSTAD, V. A. Extract of *Salacia oblonga* lowers acute glycemia in patients with type 2 diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 1, p. 124-30, Jul 2007.

WIRTH-DZIĘCIOŁOWSKA, E., KARASZEWSKA, J., SADOWSKI, T., PYŚNIAK, K., GAJEWSKA, M., Selected blood serum biochemical indicators in twelve inbred strains of laboratory mice. *Animal Science Papers and Reports* vol. 27 n. 2, 159-167. 2009.

YOSHIKAWA, M. et al. Biological activities of *Salacia chinensis* originating in Thailand: the quality evaluation guided by alpha-glucosidase inhibitory activity. *Yakugaku Zasshi*, v. 123, n. 10, p. 871-80. ISSN 0031-6903. Oct 2003.

YOSHIKAWA, M. et al. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats. *J Nutr*, v. 132, n. 7, p. 1819-24. ISSN 0022-3166. Jul 2002.

YOSHINO, K. et al. Anti-diabetic activity of a leaf extract prepared from *Salacia reticulata* in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, v. 73, n. 5, p. 1096-104. ISSN 1347-6947. May 2009

YOUSEF, B. A.; GUERRAM, M.; HASSAN, H. M.; HAMDY, A. M.; ZHANG, L. Y.; JIANG, Z. Z. Pristimerin demonstrates anticancer potential in colorectal cancer cells by inducing G1 phase arrest and apoptosis and suppressing various pro-survival signaling proteins. **Oncology Reports**. v. 35, n. 2, p. 1091-100, Feb 2016.

YOUSEF, B. A.; HASSAN, H. M.; ZHANG, L. Y.; JIANG, Z. Z. Pristimerin exhibits in vitro

and in vivo anticancer activities through inhibition of nuclear factor- κ B signaling pathway in colorectal cancer cells. **Phytomedicine**. v. 1, n. 40, p. 140-147, Jan 2018.

ZHANG, B.; ZHANG, J.; PAN, J. Pristimerin effectively inhibits the malignant phenotypes of uveal melanoma cells by targeting NF- κ B pathway. **International Journal of Oncology**. v. 51, n. 3, p. 887-898, Jul 2017.

ANEXOS

Certificado comitê de Ética no Uso de Animais CEUA / UFAM

 Poder Executivo Ministério da Educação Universidade Federal do Amazonas Comissão de Ética no Uso de Animais	CERTIFICADO	 UFAM
Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 019/2016- CEUA / UFAM, intitulado como "Avaliação da atividade hipoglicemiante e antilipolítico de extratos de <i>Solidaria impressifolia</i> (Hippocistaceae)", sob a orientação do Dr. Emerson Silva Lima e da colaboradora Dra. Clarice de Carvalho Veloso e na responsabilidade de Leonard Domingos Rosales Ache, mestrando do Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi APROVADO pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM).		
 Prof.ª Dra. Cinthya Iamile Fritiz Brandão de Oliveira Presidente do CEUA-UFAM Portaria 1595/2014 - GR		
Manaus, 05 de abril de 2017.		
Av. Gen. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 3000, Coronado, Campus Universitário, Setor Sul, CEA Bloco 1, Terceiro andar, 69077-000 - Manaus/AM		