



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

EFEITO HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Murraya paniculata* (L.)
(Laranja Jasmim) EM MODELO ANIMAL DE DIABETES.

CICERO DIEGO ALMINO MENEZES

CRATO – CE

2015

CICERO DIEGO ALMINO MENEZES

**EFEITO HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Murraya paniculata* (L.)
(Laranja Jasmim) EM MODELO ANIMAL DE DIABETES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como objetivo de obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais).

Orientador:

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-orientadora:

Prof^a. Dra. Francisca Adilfa de Oliveira Garcia

CRATO – CE

2015

CICERO DIEGO ALMINO MENEZES

**EFEITO HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO
HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Murraya paniculata* (L.)
(Laranja Jasmim) EM MODELO ANIMAL DE DIABETES.**

Dissertação submetida a coordenação do Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como objetivo de obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais. Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____ / ____ / 2015.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Orientador)

Departamento de Enfermagem – URCA

Prof^a. Dr^a. Francisca Adilfa de Oliveira Garcia (Co-orientadora)

Departamento de Biofisiologia – FMJ

Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (Membro externo)

Departamento de Farmácia – UFS

Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf (Membro Interno)

Departamento de Química Biológica - URCA

CRATO – CE

2015

À Deus, pelo dom da vida e por tornar realidade um sonho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo Lucier da Cunha Menezes e Maria do Socorro Almino Menezes, a quem tanto amo, pelo exemplo de pessoas honradas, pelo incentivo e educação dados durante toda a minha vida, em especial nessa jornada de dois anos encorajados a terminar essa pesquisa.

Aos meus irmãos, Luciflavio Almino Menezes, Cicero Thiago Almino Menezes e Luiz Gustavo Almino Menezes, pelo exemplo de pessoas que são: equilibradas, humanas e generosas, sempre presentes em todos os momentos da minha vida, apoiando, incentivando e agradecendo as maravilhas que Deus faz em nossas vidas.

A minha esposa, Edvânia Maria Luna Santana Pires, por todo o apoio, dedicação e perseverança a mim depositados durante essa caminhada, que mesmo nos momentos em que tudo parecia difícil, ela sempre com a sua sensibilidade e a capacidade de mostrar que na vida, sempre há um caminho no qual tudo se resolve, é apenas uma questão de tempo, a você os meus sinceros agradecimentos.

Ao meu sogro, Joaquim Edvan Pires e minha sogra, Maria do Socorro Luna Santana Pires, por todo o apoio, as palavras de conforto e em especial pelo carinho e acolhimento comigo.

Ao meu cunhado Victor Hugo Luna Santana Pires, as minhas cunhadas: Rassuênia Bezerra Calixto, Larissa Varela de Paiva, Ana Bárbara Menezes e Celeste Aída Luna Santana Pires, pela convivência, pela amizade, por todo o apoio e as palavras de incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pelos ensinamentos, paciência e por ter aceitado me orientar nessa pesquisa, que sem dúvida me trouxe ensinamentos para toda a minha vida.

A minha Co-orientadora, Dr^a. Francisca Adilfa de Oliveira Garcia, pelo cuidado e zelo a mim depositados, durante esses dois anos de convivência, que contribuiu não só para a minha formação profissional, mas pessoal também, sou muito grato por tudo.

A todos os meus professores de disciplinas do mestrado, George Pimentel Fernandes, Henrique Douglas Melo Coutinho, José Galberto Martins da Costa, Marta Regina Kerntopf, Roseli Barbosa, Alexandre Magno Rodrigues Teixeira, pelo conhecimento e ensinamentos compartilhados com todos os meus amigos do mestrado.

Aos amigos do mestrado, Fernando Gomes de Figueredo, Francisco Rodolpho Sobreira Dantas Nóbrega de Figueirêdo, Tiago Adolfo Sobreira Miranda, pelo companheirismo e parceria durante esses dois anos.

Aos colegas de Laboratório da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte, Tatiana Rodrigues Garcia, Maynara Rodrigues Cavalcante, Enaide Soares Santos, Alisson Cordeiro Moreira, por toda a ajuda e dedicação empregados nessa pesquisa, sem a contribuição de vocês, não seria possível realizar esse trabalho. Aos técnicos de laboratório e funcionários do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte, Maria Janice Pereira Lopes e Auryclennedy Calou de Araújo, Jucelino Francelino da Silva e Francisco Ferreira da Silva, pela colaboração durante todo o período experimental.

Aos meus amigos, em especial: Jorge Ederson Gonçalves Santana, Bruno Costa Ricardo, que sempre torceram pelo meu sucesso profissional.

A URCA por nos dar uma oportunidade de crescimento e qualificação profissional.

A Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte, na pessoa da Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana, responsável pelo Laboratório de Farmacologia e Biofisiologia, por disponibilizar o laboratório e aceitar que eu desenvolvesse esta pesquisa nesta renomada instituição.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior - CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma, contribuíram direto ou indiretamente para o sucesso dessa pesquisa.

**“Antes a tristeza de uma derrota do que a
vergonha de nunca ter lutado”**

(Roberto Shinyashiki)

EFEITO HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DE *Murraya paniculata* (L.) (Laranja Jasmim) EM MODELO ANIMAL DE DIABETES.

Menezes, C.D.A.

Murraya paniculata (Laranja Jasmim) é uma planta originária da Índia largamente utilizada na medicina popular como: antinociceptiva, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anti febre reumática e anti-disenteria. Dentre os constituintes, podem ser encontrados: flavonóides, alcalóides indol, cumarinas, isoflavonóides, óleos essenciais, polissacarídeos e ácidos graxos. O diabetes mellitus é uma das principais questões de saúde no cenário atual que afeta pessoas de diferentes faixas econômicas e idades em vários países do mundo. É considerada com uma doença crônica associada com o metabolismo anormal dos carboidratos, gorduras e proteínas que causa altos índices de morbidade e mortalidade. Este trabalho objetivou avaliar o perfil bioquímico do extrato de *Murraya paniculata* em modelo de diabetes experimental induzido por aloxano em ratos. Foram utilizados *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina, machos, adultos, pesando entre 200 e 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ. No teste de toxicidade aguda, a administração oral do extrato MPE, incluindo a dose mais alta, (2000 mg/kg), não apresentou mortalidade nas primeiras 24 horas e durante todo o período de estudo, assim como nenhum efeito de toxicidade. Para os testes de avaliação bioquímica (glicemia, colesterol, transaminases hepáticas, frutossamina e hemoglobina glicada), foram realizados segundo métodos enzimáticos padrões conforme estabelecidos nos kits de diagnóstico. O extrato de *Murraya paniculata* (MPE), foi utilizado nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg, enquanto que as drogas clássicas glibenclamida e metformina foram administradas nas doses de 5 e 50 mg/Kg, respectivamente por um período de dois meses. Os estudos de uma semana a dois meses de tratamento, mostraram uma redução significativa nos níveis de glicose, colesterol total e triglicérides plasmáticos nos grupos tratados com o extrato MPE e as drogas clássicas, em que MPE 100mg/Kg, reduziu em 57,55% seus níveis glicêmicos, ***p<0,001 e 44,39% seus níveis plasmáticos de colesterol, ***p<0,001. Foi possível perceber também, uma diminuição significativa nos níveis séricos das transaminases hepáticas, nos grupos tratados ao longo do experimento. Observou-se uma redução nos níveis de frutossamina e hemoglobina glicada, que contribuiu com a melhora nos níveis glicêmicos dos animais estudados. No estudo de potencialização do efeito hipoglicemiante do extrato MPE, observou-se um possível sinergismo entre o extrato MPE e as drogas clássicas, glibenclamida e metformina. O extrato MPE na dose de 100mg/Kg foi capaz de reverter a hiperglicemia induzida pelo diazóxido via bloqueio dos canais de K⁺, e a análise histopatológica do fígado, rins e pâncreas dos animais tratados com o extrato MPE, mostrou um padrão de normalidade ao longo dos dois meses de tratamento, mostrando que o extrato MPE apresenta uma baixa toxicidade.

Palavras-chave: perfil glicêmico, perfil lipídico, toxicidade aguda, análise histopatológica.

ANTIDIABETIC EFFECT OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF SHEETS *Murraya paniculata* (L.) (Orange Jasmine) MODEL IN DIABETES ANIMAL.

Menezes, C.D.A.

Murraya paniculata (Orange Jasmine) is a plant of India widely used in folk medicine as antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antifungal, rheumatic fever and dysentery. Among the constituents can be found: flavonoids, indole alkaloids, coumarins, isoflavonoids, essential oils, polysaccharides and fatty acids. Diabetes mellitus is a major health issues in the current environment that affects people of different economic classes and ages in countries around the world. It is considered as a chronic disease associated with abnormal metabolism of carbohydrates, fats and proteins that cause high morbidity and mortality. This work aimed to evaluate the biochemical profile of *Murraya paniculata* extract in experimental model of alloxan-induced diabetes in rats. Were used *Rattus norvegicus* Wistar strain of albino adult male, weighing between 200 and 250g, from the vivarium of the Faculty of Medicine of Juazeiro - FMJ. In an acute toxicity test, oral administration of MSE extract, including the highest dose (2000 mg / kg), none of the animals show mortality during the first 24 hours and during the whole study period, and no effect of toxicity. For biochemical evaluation tests (glucose, cholesterol, liver transaminases, fructosamine and glycated hemoglobin) were performed according to methods enzymatic standards as set out in diagnostic kits. The *Murraya paniculata* extract (MPE) was used in doses of 100, 200 and 400 mg / kg, while glibenclamide and metformin classic drugs were administered at doses of 5 and 50 mg / kg, respectively for two months . Studies of one week to two months of treatment, showed a significant reduction in glucose levels, cholesterol and plasma triglycerides in the groups treated with the MPE extract and traditional drugs, where MPE 100mg / kg, reduced by 57.55% its glucose levels, *** $p < 0.001$ and 44.39% plasma levels of cholesterol, *** $p < 0.001$. It could be observed also a significant decrease in serum levels of hepatic transaminases, in the groups treated during the experiment. There was a reduction in the levels of fructosamine and glycated hemoglobin, which contributed to the improvement in glucose levels of the animals studied. In augmentation study of hypoglycemic effect of MPE extract, there was a possible synergy between MPE and extract the classical drugs, glibenclamide and metformin. The MPE extract 100mg / kg was able to reverse at all times evaluated hyperglycemia induced by diazoxide via blockade of K^+ channels, and histopathological examination of the liver, kidneys and pancreas of animals treated with MPE extract, showed an normal range throughout the two-month experiment, showing that the MPE has a low toxicity extract.

Keywords: glycemic profile, lipid profile, acute toxicity, histopathological analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição Mundial do diabetes mellitus.....	21
Figura 2. <i>Murraya paniculata</i>	34
Figura 3. Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência representante de <i>M. paniculata</i>	48
Figura 4. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre o peso em ratos Wistar	51
Figura 5. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre a glicemia plasmática em ratos Wistar	54
Figura 6. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre os valores de triglicerídeos plasmático em ratos Wistar	60
Figura 7. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre os níveis de colesterol plasmático em ratos Wistar	64
Figura 8. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre os níveis de transaminase hepática AST em ratos Wistar.....	68
Figura 9. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre os níveis da transaminase hepática ALT em ratos Wistar	71
Figura 10. Avaliação da frutossamina após um mês de tratamento de ratos diabéticos com MPE, glibenclamida e metformina	73
Figura 11. Avaliação da HbA1C após dois meses de tratamento de ratos diabéticos com MPE, glibenclamida e metformina	75
Figura 12. Estudo de potencialização do efeito hipoglicemiante curva tempo-resposta do tratamento por via oral do extrato de <i>M. paniculata</i> sobre a glicemia plasmática em ratos Wistar	77
Figura 13. Avaliação do extrato MPE e da glibenclamida na curva glicêmica com diazóxido em ratos não diabéticos	80
Figura 14. Avaliação histopatológica controle normal (CN)	81
Figura 15. Avaliação histopatológica controle diabético (CD)	82
Figura 16. Avaliação histopatológica grupo tratado com glibenclamida 5 mg/Kg (GLI 5)	83
Figura 17. Avaliação histopatológica grupo tratado com metformina 50 mg/Kg (MET 50)	84
Figura 18. Avaliação histopatológica grupo tratado com extrato MPE 100 mg/Kg (MPE 100)	84

Figura 19. Avaliação histopatológica grupo tratado com extrato MPE 200 mg/Kg (MPE 200)	85
Figura 20. Avaliação histopatológica grupo tratado com extrato MPE 400 mg/Kg (MPE 400)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do extrato hidroalcólico de <i>M. paniculata</i>	49
Tabela 2. Variação do peso corporal dos animais ao longo do tempo	52
Tabela 3. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis de glicose plasmática, em ratos com diabetes induzido por aloxano	55
Tabela 4. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis de triglicerídeos plasmáticos, em ratos com diabetes induzido por aloxano	61
Tabela 5. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis de colesterol plasmático, em ratos com diabetes induzido por aloxano	65
Tabela 6. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis séricos de AST em ratos com diabetes induzido por aloxano	69
Tabela 7. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis séricos de ALT em ratos com diabetes induzido por aloxano	72
Tabela 8. Efeito do tratamento de médio prazo (um mês) com MPE sobre as concentrações de frutossamina em ratos diabéticos induzido por aloxano	74
Tabela 9. Efeito do tratamento prolongado (dois meses) com extrato de <i>M. paniculata</i> e drogas clássicas sobre as concentrações de Hemoglobina Glicada (HbA1C) em ratos diabéticos induzido por aloxano	75
Tabela 10. Efeito do tratamento com extrato MPE (estudo de potencialização – Uma semana) sobre os níveis de glicose plasmática em ratos com diabetes induzido por aloxano	78
Tabela 11. Avaliação do extrato de <i>M. paniculata</i> (MPE) e glibenclamida na curva glicêmica com diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ad libitum – à vontade

ADA – Associação Americana de Diabetes

AGES – Advanced glycated end-products

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

CD – controle diabético

CEUA – Comissão de Experimentação e Uso de Animais

DL₅₀ – dose letal mínima

DM – diabetes melito

DM1 – diabetes mellitus tipo 1

DM2 – diabetes mellitus tipo 2

DZD – diazóxido

EROS – espécies reativas de oxigênio

FMJ – Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte

Gli – glibenclamida

HbA1c – hemoglobina glicosilada

i.v – intravenoso

IDF – International Diabetes Federation

Met – metformina

MPE – extrato de *Murraya paniculata*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAI-I – fator inibidor da ativação do plasminogênio

PPAR – receptores ativados por proliferador de peroxissoma

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

UKPDS – United Kingdom Prospective Diabetes Study

Urca – Universidade Regional do Cariri

v.o – via oral

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo Geral:	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. Referencial Teórico	20
3.1 O diabetes mellitus.....	20
3.2 Classificação do diabetes mellitus.....	22
3.3 Complicações micro e macrovasculares do diabetes	23
3.4 Diagnóstico e monitoramento do diabetes mellitus	24
3.4.1 Frutosamina	25
3.4.2 Hemoglobina glicada	25
3.5 O papel da insulina	27
3.6 Diabetes <i>mellitus</i> experimental	28
3.7 Farmacoterapia no tratamento do DM tipo 2	29
3.8 Plantas medicinais e Fitoterapia	32
3.9 Espécie botânica em estudo	33
3.9.1 Taxonomia	33
3.9.2 Sinonímia	33
3.9.3 Nomes populares	33
3.10 Família Rutaceae	33
3.11 <i>Murraya paniculata</i>	34
4. Metodologia	36
4.1 Material Botânico	36
4.2 Análise Fitoquímica	36
4.2.1 Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais	36
4.2.2 Quantificação dos compostos por meio de HPLC-DAD	36
4.3 Drogas	37
4.4 Preparação do extrato vegetal	38

4.5 Teste de Toxicidade Aguda	38
4.6 Delineamento do estudo	39
4.7 Período e local de estudo	39
4.8 População e amostra	39
4.9 Critérios de inclusão e exclusão da coleta de dados	40
4.10 Grupos experimentais	40
4.10.1 Marcação e pesagem dos animais	41
4.10.2 Tratamento dos animais	41
4.11 Indução do diabetes	41
4.12 Avaliações dos efeitos do extrato de <i>M. paniculata</i> e dos fármacos de referência sobre os parâmetros bioquímicos	41
4.12.1 Testes pilotos de curta e longa duração.....	41
4.12.2 Potencialização do efeito do extrato de <i>M. paniculata</i>	42
4.13 Determinações bioquímicas	42
4.13.1 Glicose	42
4.13.2 Colesterol total	43
4.13.3 Triglicerídeos	43
4.13.4 AST	44
4.13.5 ALT	44
4.13.6 Frutosamina	45
4.13.7 Hemoglobina glicada	45
4.14 Investigação do mecanismo de ação via bloqueio de canais de K ⁺ ATP-dependentes na hiperglicemia induzida por diazóxido (DZD)	46
4.15 Avaliação histopatológica dos rins, fígado e pâncreas	46
4.16 Métodos estatísticos	47
5. Resultados e Discussão	48
5.1 Perfil Químico	48
5.2 Teste de toxicidade aguda	49
5.3 Ganho ou redução do peso	50
5.4 Considerações sobre o experimento	52

5.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Glicose	53
5.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Triglicerídeos	58
5.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Colesterol Total	62
5.8 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Transaminase hepática (AST – TGO)	66
5.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Transaminase hepática (ALT – TGP)	70
5.10 Atividade hipoglicemiante do extrato de <i>M. paniculata</i> e das drogas clássicas (glibenclamida e metformina) através de dois métodos de rastreio da glicação: Frutosamina e Hemoglobina glicada	73
5.11 Estudo de associação das drogas – Uma semana de tratamento	76
5.12 Determinação do mecanismo de ação do extrato de <i>M. paniculata</i> via bloqueio de canais de K ⁺ na hiperglicemia induzida por diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos	79
5.13 Análise histopatológica	81
6. Conclusão	87
Referências Bibliográficas	88
Apêndices	97
Anexos	108

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis representam a maior carga de morbimortalidade no Brasil. Em 2011, o Ministério da Saúde lançou seu plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis, enfatizando ações populacionais para controlar as doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doença respiratória crônica, predominantemente pelo controle do fumo, inatividade física, alimentação inadequada e uso prejudicial de álcool (DUNCAN *et al*, 2012).

O diabetes é uma das principais questões de saúde no cenário atual e está afetando muitas pessoas de diferentes idades de vida em quase todos os países do mundo. É uma doença crônica e está associada com o metabolismo anormal dos carboidratos, gorduras e proteínas. Níveis elevados de açúcar no sangue em jejum e pós-prandial são uma característica específica do diabetes (ROGLIC & UNWIN, 2010).

Esta patologia constitui-se como uma desordem metabólica complexa, que se caracteriza por anormalidades no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, resultando em profunda ou absoluta deficiência de insulina, caracterizando o diabetes tipo 1 ou da resistência dos tecidos periféricos à insulina, característico do diabetes tipo 2. O tipo 3 é o diabetes gestacional, apresentando intolerância aos carboidratos durante a gravidez (SOUSA *et al*, 2011). A Sociedade Brasileira de Diabetes, toma como base um quarto tipo de diabetes, classificada como outros tipos específicos de diabetes mellitus, que pode estar relacionado a defeitos genéticos na função das células beta, defeitos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outras condições (SBD, 2013).

O diabetes mellitus (DM) configura-se hoje como uma epidemia mundial, representando grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. A prevalência de DM está aumentando por causa do crescimento e do envelhecimento populacional, maior urbanização, crescente prevalência da obesidade, sedentarismo e maior sobrevida do paciente diabético (FERREIRA CLR & FERREIRA MG, 2009).

Segundo MANNA (2007), as formas de DM que apresentam deficiência total ou parcial da secreção de insulina deverão receber reposição hormonal com insulina exógena. Já nas formas de DM em que o principal mecanismo fisiopatológico for a resistência insulínica, o controle da situação geradora desta resistência deverá receber o tratamento primário, como, por exemplo, suspensão de droga hiperglicemiante, tratamento da obesidade e mudança de estilo de vida.

O DM tipo 1 é caracterizado pela destruição das células-beta pancreáticas, geralmente levando a uma dependência absoluta de insulina. Na maioria dos casos, esta é uma destruição de origem auto imune. Já o DM tipo 2 tem etiologia multifatorial, incluindo fatores genéticos e ambientais que resultam da combinação de um aumento da resistência à insulina em tecidos periféricos, associada com o aumento de gordura visceral e uma disfunção progressiva das células-beta pancreáticas (LIBMAN, 2009).

A prevalência do diabetes mellitus (DM) na população adulta mundial é de cerca de 4%, podendo variar de acordo com a etnia e os hábitos de vida da população estudada, como alimentação, atividade física e prevalência de obesidade. Estima-se que cerca de, 35% a 50% dos indivíduos com DM tipo 2 (DM2) não saibam ter a doença, o que de forma significativa contribui, em muitos casos, para que já no diagnóstico clínico tenhamos a presença de alterações micro e macrovasculares (CHEN, *et al* 2011).

O diagnóstico correto e precoce do diabetes e das alterações da tolerância à glicose é extremamente importante porque permite que sejam adotadas medidas terapêuticas que podem evitar o aparecimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída e retardar o aparecimento das complicações crônicas nos pacientes diagnosticados com diabetes. Os critérios diagnósticos baseiam-se na glicose plasmática de jejum (8 horas), nos pontos de jejum e de 2h após sobrecarga oral de 75g de glicose (teste oral de tolerância à glicose – TOTG) e na medida da glicose plasmática casual (GROSS *et al*, 2002).

Os recursos financeiros envolvidos no tratamento, recuperação e manutenção de pacientes portadores desta patologia são altos para a sociedade. Neste sentido, há constante necessidade da busca de novas alternativas terapêuticas de origem natural ou sintética. A fitoterapia e o uso de plantas medicinais fazem parte da prática da medicina popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral. (BRUNIN *et al*, 2012).

Neste sentido, um grande número de espécies de plantas tem sido usado experimentalmente para tratar os sintomas do DM. Porém, somente algumas espécies apresentam substâncias com potencial terapêutico, enquanto outras podem produzir hipoglicemia como um efeito colateral devido à sua toxicidade, especialmente hepatotoxicidade.

A *Murraya paniculata* (sinonímia *Murraya exotica*), pertencente à família Rutaceae, é uma árvore nativa da Índia que foi introduzida no Brasil, sendo largamente utilizada em arborização e em jardins. Esta espécie é considerada medicinal nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e também na China e Indonésia. Nesses países, as folhas e raízes são utilizadas para o tratamento de problemas intestinais, de reumatismo e tosse (MESQUITA *et*

al, 2008). Além disso, Gautam e colaboradores (2012a) em estudos utilizando modelo de diabetes experimental, relatam o efeito hipoglicemiante desta planta em ratos. Desta forma, a *Murraya paniculata* é considerada uma planta comumente encontrada e que apresenta um uso bastante difundido para diversas finalidades na região do cariri Cearense.

A pesquisa com produtos provenientes de plantas é importante por possibilitar a diversificação do arsenal terapêutico existente hoje, uma vez que contribui para a descoberta de novas moléculas capazes de tratar diversas patologias, sendo alvo de investigação na nossa pesquisa, o tratamento do DM. O acompanhamento do diabetes, no presente trabalho, foi realizado em curto prazo (uma e duas semanas) com o objetivo de ver as ações mais agudas do DM e prever as ações curativas das drogas em estudo. E em longo prazo (um a dois meses) como forma de avaliar a ação do Extrato de *Murraya paniculata* (MPE) sobre a glicação de proteínas (estado da hiperglicemia crônica).

Este trabalho representa o primeiro estudo subcrônico hipoglicemiante utilizando o extrato hidroalcolico das folhas da espécie *M. paniculata* utilizando o modelo de aloxano em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar o perfil bioquímico de ratos tratados com o extrato das folhas de *Murraya paniculata* L. (MPE) em modelo de diabetes experimental.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Realizar a análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *M. paniculata*.
- ✓ Realizar a análise de toxicidade aguda segundo o teste hipocrático;
- ✓ Avaliar o efeito hipoglicemiante a médio e longo prazo do extrato de *M. paniculata* através da dosagem de frutossamina e hemoglobina glicada;
- ✓ Avaliar o possível potencial hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico do extrato da planta, através de determinações bioquímicas segundo métodos enzimáticos padrões;
- ✓ Avaliar efeito sobre a função hepática através da dosagem das transaminases hepáticas AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase) segundo métodos enzimáticos padrões;
- ✓ Avaliar possível potencialização do efeito hipoglicemiante através das associações do extrato de *M. paniculata* com glibenclamida e do extrato de *M. paniculata* com metformina.
- ✓ Verificar os efeitos do extrato de *M. paniculata* na hiperglicemia induzida pelo diazóxido (DZD).
- ✓ Avaliar do ponto de vista histológico, possíveis alterações nos rins, fígados e pâncreas de ratos diabéticos na presença e ausência de tratamento com o extrato de *M. paniculata*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia com metabolismo deficiente de carboidratos, gorduras e proteínas (DAVEY *et al*, 2014). Caracteriza-se por uma elevação nos níveis de glicose plasmática, resultante da menor secreção de insulina, resistência a sua ação periférica, ou ambos. Nas últimas décadas, essa condição tem vindo a ser considerada uma pandemia mundial. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a prevalência de diabetes mellitus é de 2,8% entre a população mundial com mais de 20 anos de idade (MATOS *et al.*, 2011).

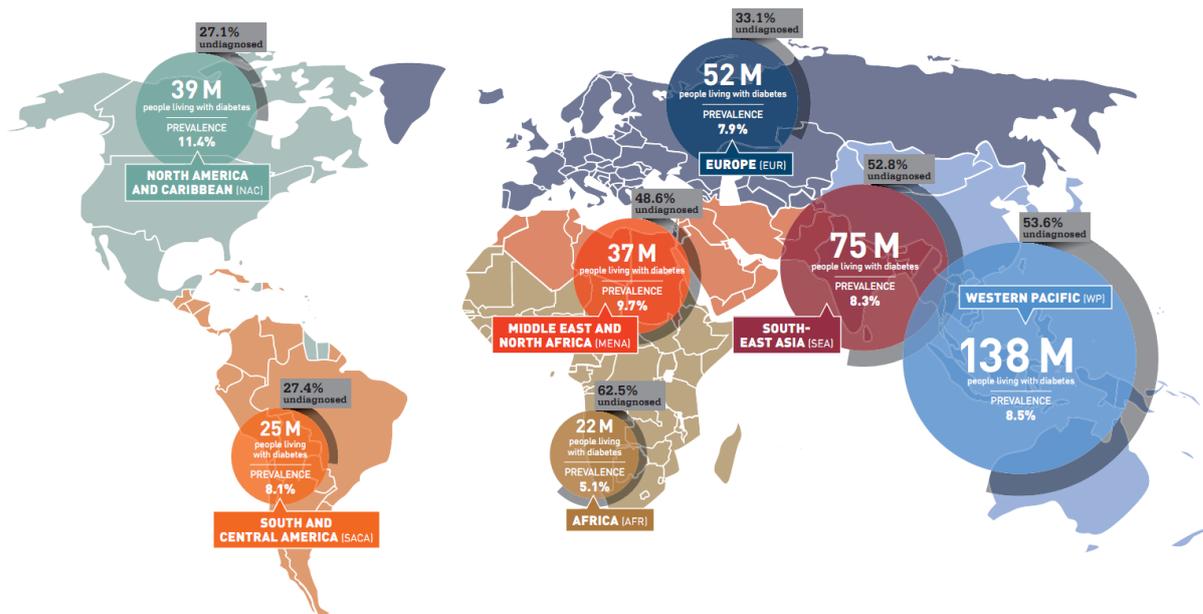
A prevalência do DM tem aumentado vertiginosamente e espera-se um incremento ainda maior, em muitos países do mundo, os países em desenvolvimento apresentam uma tendência maior de aumento na frequência de DM em todas as faixas etárias, principalmente nas mais jovens, cujo impacto negativo sobre a qualidade de vida e a carga da doença aos sistemas de saúde é imensurável (SARTORELLI & CARDOSO, 2006).

A adoção de um estilo de vida pouco saudável, o envelhecimento, a urbanização crescente e a intensificação da globalização, contribuem para o aumento dessa doença e torna-se um desafio para os sistemas de saúde em todo o mundo (STOPA *et al*, 2014).

A sexta edição do atlas de diabetes, mostrou que no ano de 2014 existiam cerca de 387 milhões de pessoas com diabetes mellitus em todo o mundo, e que no ano de 2025, há uma estimativa de que esse valor cresça ainda mais, algo em torno de 53%, o que representa um total de 592 milhões de pessoas com DM. A África apresenta o número estimado mais baixo de pessoas com diabetes: 22 milhões de pessoas em 2014, e uma estimativa de 42 milhões de pessoas com diabetes em 2025, (Figura 1). A região do pacífico ocidental e o sudeste da Ásia respondem pelos números mais altos, com prevalência de 138 milhões e 75 milhões respectivamente, em 2014, podendo esse valor chegar a 202 milhões e 123 milhões de pessoas em 2025, respectivamente (IDF, 2014).

No ano de 2014, as taxas de pessoas com DM na América do Norte e Europa eram de: 39 milhões e 52 milhões, respectivamente, podendo chegar a 50 milhões e 69 milhões de pessoas, respectivamente com diabetes em 2025. Na América do Sul e Central a prevalência era de 25 milhões de pessoas em 2014, com uma estimativa no ano de 2025 de até 39 milhões de pessoas com diabetes, Figura 1. (IDF, 2014).

Figura 1. Distribuição Mundial do Diabetes mellitus



Fonte: Diabetes Atlas, sixth edition, 2014.

Em 2011, as regiões da América Central e América do Sul, que concentram países em desenvolvimento, apresentaram uma estimativa de 25,1 milhões de pessoas com diabetes mellitus. Este contingente populacional equivale a 8,7% da população de 20 a 79 anos com possibilidade de aumentar em 60% nos próximos 20 anos.

De acordo com o Ministério da Saúde, mais de 10 milhões de brasileiros tem diabetes, dos quais 33% estão entre 60 e 79 anos de idade (STOPA *et al*, 2014). Dados Brasileiros de 2010 mostram que as taxas de mortalidade por DM (por 100 mil habitantes) apresentam acentuado aumento com o progredir da idade, variando de 0,50 para a faixa etária de 0 a 29 anos a 213,4 para a de 60 anos ou mais, ou seja, um gradiente de 427 vezes (SBD, 2013).

Nas últimas décadas, a proporção da mortalidade atribuível as doenças não-transmissíveis aumentou significativamente no Brasil, nesse contexto o diabetes mellitus, está entre as dez principais causas de mortalidade, contribuem para esse cenário desfavorável, a alta prevalência de diabéticos não diagnosticados e a expressiva proporção de casos com evidências de complicações ao diagnóstico (GEORGE *et al*, 2005).

Com o aumento da prevalência do DM em escala mundial e a sobrevivência dos pacientes diabéticos cada vez maior, é de se esperar um aumento na prevalência das complicações dessa doença, sendo essencial e importante a adoção de medidas de prevenção, controle e diagnóstico precoce para diminuir tais complicações (ANTÃO *et al*, 2007).

3.2 Classificação do diabetes mellitus

Conforme consta nas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), a classificação atual do DM baseia-se na etiologia da doença, e não no tipo de tratamento utilizado pelos pacientes. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (SBD, 2013).

O DM tipo 1 é uma doença multifatorial, em que uma predisposição genética e fatores ambientais promovem a auto imunidade crônica contra as células beta pancreáticas. Com o tempo, a auto imunidade leva a uma perda de células beta e detecção do diabetes. É comumente diagnosticado na infância e adolescência, mas também ocorre na idade adulta (PUGLIESE, 2014).

O DM tipo 2 é caracterizado por uma deficiência ou falha na manutenção da homeostase da glicose, resulta de defeitos na secreção e ação da insulina, está intimamente associada com a obesidade, sedentarismo e um histórico familiar de diabetes, é um fator de risco para complicações microvasculares, insuficiência renal, cegueira, doença cardiovascular e dislipidemia (DISTEFANO & WATANABE, 2010).

Diabetes gestacional é um tipo de DM que é diagnosticado durante a gravidez, filhos de mães com diabetes gestacional, apresentam um risco maior de desenvolver diabetes e obesidade (COUSTAN, 2013). Semelhante ao Diabetes Mellitus tipo 2, o Diabetes Mellitus gestacional associa-se tanto à resistência à insulina quanto a diminuição da função das células beta pancreáticas (SBD, 2013).

Outros tipos específicos de DM, constituem uma quarta classificação do DM, e pode ser reportado por uma gama de fatores, dentre os quais relacionados a defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, induzido por medicamentos ou agentes químicos e infecções (SBD, 2013).

Estudos recentes mostram a semelhança fisiológica existente entre o Alzheimer e o DM, sendo que este é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, estas semelhanças fisiológicas incluem: processos relacionados ao envelhecimento e degeneração, desordens metabólicas, níveis elevados de colesterol, aumento do stress oxidativo e aumento da resposta inflamatória, entre outras (HÖLSCHER & LI, 2007).

Diabetes mellitus tipo 2 e a doença de Alzheimer são mais prevalentes com o avançar da idade, evidências sugerem que pacientes que apresentam diabetes mellitus tipo 2 tem um risco aumentado de contrair a doença de Alzheimer, estudos em modelos animais com diabetes

mellitus tipo 2 mostraram redução no transporte de insulina para o cérebro, redução da absorção de insulina além de uma redução neuronal de insulina, o que pode levar a uma diminuição da memória (AKTER *et al*, 2011).

3.3 Complicações micro e macrovasculares do diabetes

As consequências do DM a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam à disfunção, dano ou falência dos órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ou neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual (SBD, 2006).

De uma forma geral, as complicações em longo prazo no DM, parecem estar relacionados a proporção do descontrole metabólico, em que a deficiência de insulina, a elevação dos níveis plasmáticos de glicose, assim como o tempo de exposição, são fatores determinantes para essas complicações (KAHN *et al*, 2009).

Aproximadamente um terço da mortalidade em pacientes diabéticos, são oriundos de doenças cardiovasculares, a incidência de diabetes e obesidade está em constante ascensão, as complicações do diabetes tem efeitos deletérios sobre tecidos e vários órgãos do corpo, culminando com a morbidade e mortalidade da doença (ZHANG, 2014).

A hiperglicemia crônica no diabetes conduz a várias alterações no corpo de natureza metabólica, hormonal, e fisiológica, que podem desencadear complicações secundárias, que são responsáveis pela maior morbidade do DM (DAVEY *et al*, 2014).

Concentrações elevadas de glicose estimulam a formação de produtos avançados de glicação não enzimática, os chamados AGES (AGEs – do inglês, *Advanced Glycated End-Products*, (BERTOLUCI *et al*, 2008). Em indivíduos diabéticos, a exposição a açúcares oxidados, assim como o aumento da concentração lipídica, resultará em lipoxidação, que também é considerado um mecanismo intermediário na formação dos AGES, estes irão produzir danos estruturais e funcionais a macromoléculas (CHILELLI *et al*, 2013).

Esses produtos de glicação não enzimática podem acumular em locais específicos como: retina, placas ateroscleróticas e rim, sendo o rim considerado o principal alvo das AGES, uma vez que esse órgão é considerado o maior sítio de depuração dessas moléculas (REIS *et al*, 2008).

A nefropatia nos pacientes diabéticos é uma preocupação não só porque pode resultar em insuficiência renal terminal, mas também porque está associada com doença cardiovascular

e porque é uma complicação frequentemente descrita no diabetes mellitus (WILMOT & IDRIS, 2014).

A nefropatia diabética é uma complicação do DM associada à grande morbimortalidade. A detecção da microalbuminúria, nos pacientes diabéticos, tem como finalidade a identificação de pacientes com risco de complicações renais antes da ocorrência de maiores danos a esse órgão (SBEM, 2004).

A retinopatia diabética é uma desordem da vascularização retiniana caracterizada por anormalidades microvasculares (microaneurismas e hemorragias intrarretinianas), progredindo para alteração da permeabilidade vascular, má perfusão tecidual, edema e isquemia retiniana e anormalidades microvasculares intrarretinianas. A fase avançada, associada ao aumento do risco de cegueira, é chamada retinopatia diabética proliferativa e determinada pela presença de neovascularização da retina ou do disco óptico (VALIATTI, 2011).

A neuropatia diabética periférica é uma das complicações mais prevalentes nesses pacientes, podendo acometer até 80% desses indivíduos, é uma complicação progressiva e irreversível, a neuropatia leva a uma perda das informações sensoriais cutâneas nos pés, podendo ocasionar transtornos da estrutura osteoarticular dessa região, além de contribuir para modificar a marcha, o equilíbrio estático e dinâmico (SALES *et al*, 2012).

A doença macrovascular no paciente diabético é a própria doença aterosclerótica, que incide em uma população não diabética. É contudo, mais precoce, mais frequente e mais grave, é a maior causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes, a prevenção primária da doença macrovascular está relacionada com a própria prevenção do diabetes (SBD, 2013).

3.4 Diagnóstico e monitoramento do diabetes mellitus

O controle da glicemia reduz de forma significativa as complicações do DM. Desta forma, métodos que avaliam a frequência e a magnitude da hiperglicemia são essenciais no acompanhamento do diabetes. Atualmente são aceitos três critérios para o diagnóstico do diabetes mellitus: sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de uma glicemia casual $> 200\text{mg/dL}$; glicemia de jejum $\geq 126\text{ mg/dL}$ e glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75g de glicose $> 200\text{ mg/dL}$. Ao longo do tempo houve avanços significativos nos métodos de controle da glicemia a médio e longo prazo, como exemplo desses métodos, pode-se ter a dosagem de frutossamina e hemoglobina glicada, respectivamente (SBD, 2013).

3.4.1 Frutosamina

A frutosamina consiste de uma forma estável de proteínas glicadas, que são incorporadas a glicose por um mecanismo de ligação não enzimático, sofrendo assim modificação pós-translacional. Sua determinação em pacientes diabéticos é considerada importante, pois níveis elevados no sangue dessa proteína, indicam o aumento da glicação proteica (SHAFI *et al*, 2012).

A dosagem de frutosamina apresenta um aumento em portadores de DM devido a formação de aldíminas instáveis e reversíveis, rearranjadas a cetoaminas. Pode ser utilizada como parâmetro auxiliar no controle glicêmico de portadores de DM onde a aplicabilidade da HbA1c é limitada, como nas hemoglobinopatias, hemólise e anemia. Representa a concentração média da glicose em duas a três semanas e funciona como parâmetro alternativo para a monitoração da glicemia capilar no controle glicêmico a curto prazo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

Pode ser uma ferramenta capaz de avaliar o controle glicêmico em pacientes diabéticos e transplantados de ilhotas (THARAVANIJ *et al*, 2009). Em indivíduos portadores de complicações vasculares e nefropatias é útil para a avaliação do controle glicêmico assim como para a avaliação da morbi-mortalidade em indivíduos com diabetes descontrolada. A frutosamina também pode ser utilizada na avaliação do controle glicêmico a curto prazo em gestantes que desenvolvem diabetes gestacional, (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010).

3.4.2 Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada define-se por um grupo de substâncias resultantes da reação entre a hemoglobina A (HbA) e um açúcar, no qual o componente mais importante é a fração A1C, formado por um resíduo de glicose ligado ao grupo amino terminal do aminoácido valina. A ligação entre a HbA e a glicose é o produto de uma reação não-enzimática definida como glicação, ocorrendo em maior ou menor grau, conforme o nível de glicemia (KUMAR *et al*, 2010).

A hemoglobina glicada permanece dentro das hemácias e a sua concentração, depende da meia-vida e da taxa glicêmica média. A membrana da hemácia é altamente permeável à molécula de glicose, fazendo com que a hemoglobina presente no seu interior fique exposta praticamente à mesma concentração da glicose plasmática. A reação entre a glicose e a

hemoglobina glicada ocorre em duas fases, sendo a primeira fase reversível e que origina um composto intermediário denominado pré-A1C ou base de Schiff e a segunda fase é irreversível e resulta em um composto estável denominado HbA1c (KUMAR *et al*, 2010). Cerca de 4% a 6% do total de HbA1c apresenta-se glicada em pacientes não-diabéticos, sendo que no diabético descompensado, esse número pode ser duas a três vezes acima do normal.

Diante disso, níveis de hemoglobina glicada acima de 7% são considerados um risco progressivamente maior de complicações crônicas, levando ao conceito de que esse valor é o limite para a revisão do esquema terapêutico do diabetes em vigor. As outras frações da hemoglobina A1 originam-se da ligação de outros elementos à porção valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina A: A1a1 (frutose-1,6-bifosfato), A1a2 (frutose -6-fosfato) e A1b (Ácido pirúvico). Quando o processo de glicação ocorre em outros pontos de cadeia beta e na cadeia alfa, origina-se a molécula da hemoglobina glicada A₀. O somatório de todas as frações da hemoglobina A₁ e A₀ resulta na chamada hemoglobina glicada total (GALAN *et al*, 2008).

O nível de hemoglobina glicada resulta no somatório de todas as hemácias circulantes no organismo, seguindo o ciclo de vida de 120 dias. A glicose dos últimos 30 dias antes da dosagem da hemoglobina glicada contribui com 50% da HbA1c, e os níveis glicêmicos dos últimos dois a quatro meses contribuem com 25%, Concluindo, que a hemoglobina glicada consiste, na média ponderada do níveis glicêmicos de 60 a 90 dias antes do exame (SELVIN *et al*, 2010).

A hemoglobina glicada é uma dosagem bioquímica que auxilia na determinação do controle da glicose em pacientes diabéticos. Porém, novas recomendações da *American Diabetes Association* indicam o uso da hemoglobina glicada para o diagnóstico do diabetes mellitus, com base na associação estabelecida entre hemoglobina glicada e as complicações microvasculares da doença. Além disso possui várias vantagens sobre a glicemia de jejum, como a maior reprodutibilidade, a possibilidade de ser avaliada no estado fora do jejum, e a facilidade de monitorização da glicose (SELVIN *et al*, 2010).

Deve ser avaliada rotineiramente em todos os pacientes com DM para documentar o grau de controle glicêmico. As metas de tratamento são baseadas em resultados de estudos clínicos prospectivos e randomizados. De acordo com o *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), os testes de HbA1c devem ser realizados pelo menos duas vezes ao ano por todos os pacientes diabéticos. Dessa forma, manter o nível de HbA1C abaixo de 7% no portador de diabetes reduz significativamente o risco de desenvolvimento das complicações micro e macrovasculares em relação ao paciente cronicamente descontrolado (LITTLE & ROBERTS, 2009).

A doença cardiovascular é a principal consequência do diabetes mellitus. Recomendações para o diagnóstico desta doença baseiam-se nas relações de glicose em jejum e hemoglobina glicada com doença microvascular, indicando que a hemoglobina glicada é um marcador útil de um possível risco cardiovascular e morte por qualquer causa (SELVIN *et al*, 2010).

3.5 O papel da insulina

A insulina é um hormônio produzido pelo organismo através das Ilhotas de Langerhans no pâncreas, através da extremidade β . Ela regula a homeostase da glicose e atua de maneira coordenada em eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos e de crescimento. O mecanismo molecular da ação da insulina evidenciado em estudos, mostram que depende da remoção do efeito inibitório da subunidade α sobre a atividade da sub-unidade β do seu receptor. Induz a auto fosforilação aumentando a capacidade de fosforilar um ou mais substratos proteicos intracelulares (BEARDSALL *et al*, 2008).

A insulina molecular retira a glicose sanguínea enviando-as para o interior das células, principalmente as musculares, na forma de glicogênio. Ocorre a oxidação do glicogênio nos músculos em ácido pirúvico, chegando finalmente a anidrido carbônico e água. O piruvato armazena-se e é reduzido a ácido láctico, podendo voltar a ácido pirúvico, e enfim ser metabolizado (BRUNKHORST *et al*, 2008).

A glicose é fosforilada a partir da enzima glicocinase, formando a glicose-6-fosfato, com produção de ATP. O aumento na concentração de ATP/MgADP que é produto do metabolismo da glicose, fecha o canal, que leva a um aumento da carga positiva dentro da célula β , com consequente despolarização da membrana, causando abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Esse aumento de cálcio intracelular gera a secreção da insulina (GRIBBLE & REIMAN, 2003; HENQUIN, 2004).

Após a secreção, a insulina promove a captação, armazenamento e rápida utilização da glicose nos tecidos, como fígado, músculo e tecido adiposo. Altas concentrações de insulina, estimulam a glicólise para liberação de energia, a glicose que não é utilizada imediatamente, é captada pelo fígado e músculo, sendo convertida em glicogênio.

No fígado, a insulina estimula a glicogênio sintase a produzir glicogênio, além de inibir a glicogênio fosforilase e a gliconeogênese. No músculo, esse hormônio aumenta a síntese de glicogênio, estimula a glicólise e a captação de glicose por aumentar o número de receptores (GLUT-4). Enquanto que no tecido adiposo, a insulina promove a lipogênese, uma vez que

aumenta a atividade da lipoproteína lipase, esta libera ácidos graxos para a síntese de triglicérides. A insulina ainda promove a entrada de aminoácidos na célula para estimular a síntese proteica (TAHA & KLIP, 1999; BEARDSALL *et al.*, 2003; MOORE *et al.*, 2003)

3.6 Diabetes *mellitus* experimental

O aloxano (2,4,5,6-tetrapirimidina) é um composto muito hidrofílico, quimicamente instável, apresentando uma meia-vida de 1,5 min a pH 7,4 e 37°C (LENZEN, 2008). Dunn, Sheehan e McLethie em 1943 reportaram as propriedades diabetogênicas do aloxano após constatar que a droga causava necrose nas ilhotas pancreáticas em coelhos que receberam a administração dessa droga. Dessa forma o aloxano tem sido utilizado em experimentação com animais para indução do DM (LENZEN & MUNDAY, 1991).

O aloxano causa uma elevação na secreção de insulina seja na presença ou ausência de glicose. Este atua sobre as células beta pancreáticas, induzindo a liberação de insulina.

A formação de espécies reativas de oxigênio, as chamadas (EROs) são oriundas da redução do aloxano para formação do ácido dialúrico (LENZEN, 2008). O aloxano ao reagir com o ácido dialúrico dá origem a um radical aloxano intermediário (HA.) e a outra substância chamada “composto 305”. Além disso, este agente químico reage com dois grupamentos –SH no sítio de ligação da enzima glicoquinase, o que resulta na formação de ligações dissulfeto e consequentemente inativação da enzima glicoquinase (LENZEN & MUNDAY, 1991).

As espécies reativas de oxigênio tem como alvo o DNA das células pancreáticas, pois estas moléculas causam destruição das membranas celulares e quebra no DNA (SAKURAI & OGISO, 1995). O aloxano também é responsável por elevar os níveis de Ca^{2+} livre citossólico nas células beta do pâncreas, causando despolarização das ilhotas de Langerhans (PARK *et al.*, 1995). A ação tóxica do aloxano é evidenciada por diferentes processos, que incluem a oxidação dos grupamentos –SH, inibição da glicoquinase, geração de radicais livres além dos distúrbios na homeostase intracelular do cálcio. Sendo a geração de radicais livres e os distúrbios na homeostase do cálcio, as causas principais pela liberação fisiológica de insulina e consequente desgaste das ilhotas de Langerhans (KLIBER *et al.*, 1996; SZKUDELSKI, 2001, LENZEN, 2008).

3.7 Farmacoterapia no tratamento do DM tipo 2

Os agentes antidiabéticos devem ser utilizados em pacientes que apresentam diabetes mellitus tipo 2, quando estes não respondem adequadamente as medidas não medicamentosas, daí a possibilidade de associar estes medicamentos, tendo como objetivo o controle glicêmico e a promoção da hemoglobina glicada (SBD, 2013). O tratamento do Diabetes deve ter como meta a normoglicemia, devendo dispor de boas estratégias para a sua manutenção em longo prazo.

De acordo com o mecanismo de ação principal, os antidiabéticos orais podem ser separados em: medicamentos que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilureias e glinidas); reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases); diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); e/ou aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas), (SBD, 2013).

As biguanidas são fármacos hipoglicemiantes que atuam melhorando a ação da insulina no fígado, sendo capaz de diminuir a produção hepática da glicose em 30% e nos músculos aumentam a capacidade de absorção da glicose em 40%, com o aumento da glicogênese. O principal representante desta classe de fármacos é a metformina, sendo bastante utilizada e difundida por apresentar menos efeitos colaterais (BASHIR *et al*, 2012).

A metformina é uma biguanida que atua como sensibilizadora de insulina, sendo bastante segura para o uso em jejum, pois não provoca hipoglicemia severa. Age no tecido adiposo sobre os adipócitos, inibindo a lipólise e a disponibilidade de ácidos graxos livres. Estudos comprovam que essa droga é capaz de melhorar a afinidade dos receptores de insulina, tanto nos adipócitos como nos músculos esqueléticos e aumenta a atividade da tirosina-quinase do receptor de insulina nas células, estimulando a translocação do GLUT4 e a atividade da glicogênio-sintase (BODMER *et al*, 2010).

Quando utilizada no tratamento do diabetes mellitus é absorvida no intestino e excretada pelos rins, quase não sendo metabolizada pelo fígado. A metformina tem baixa afinidade pelas mitocôndrias celulares dos adipócitos, pois não interfere na fosforilação oxidativa. Quando não se consegue um controle satisfatório, pode ser utilizada em associação com sulfoniluréia, acarbose, tiazolidinediona, repaglinida e ou insulina (BOURRON *et al*, 2010).

Essa droga melhora o perfil lipídico dos pacientes que utilizam esses hipoglicemiantes orais. Ocorre a redução de 20-25% dos triglicerídeos e 10% do LDL-Colesterol, além de aumentar o HDL-Colesterol em até 17% e causar uma diminuição do fator inibidor de ativação

do plasminogênio (PAI-I) em 20-30%. Uma combinação com insulina foi mais eficaz no controle de glicemia, com um ganho de peso menor (MARIC, 2010).

Como efeitos colaterais as biguanidas podem apresentar: desconforto abdominal e diarreia, enquanto que os efeitos benéficos são: diminuição de eventos cardiovasculares, prevenção do diabetes mellitus tipo 2, melhora do perfil lipídico e diminuição do peso (SBD, 2013).

As sulfoniluréias são os fármacos mais comumente prescritos para o tratamento do diabetes tipo 2. São fármacos compostos por 3 gerações, onde os de 1ª geração, como a clorpropamida, possuem vida-média de ação mais longa, em torno de 30-60 horas. Os de 2ª geração (glibenclamida, glicazida e glipizida) e 3ª geração (glimepirida) possuem uma meia-vida mais curta de cerca de 8-16 horas (SATO *et al*, 2012).

Acredita-se que as sulfoniluréias agem sobre as células beta-pancreáticas diminuindo sua sensibilidade, resultando na regulação dos canais de potássio. Em curto prazo, elas aumentam a secreção de insulina, mas ao longo do uso crônico (acima de 6 meses) diminuem a secreção desse hormônio, relacionados com efeitos extra pancreáticos. Estudos indicam que as sulfoniluréias são ainda capazes de aumentar o número de receptores de insulina (CAMPBELL, 2009).

O tratamento das sulfoniluréias é iniciado seguindo critérios e diretrizes do tratamento do diabetes mellitus, sendo que o tipo e a geração que será utilizada depende da idade do indivíduo, da tolerância e da resposta positiva ao tratamento medicamentoso com essa classe de hipoglicemiantes. É recomendado utilizar a terapêutica com apenas um comprimido e se necessário aumentar a dose, tendo o cuidado para não ultrapassar as doses máximas diárias (STERI *et al*, 2010).

O uso crônico das sulfoniluréias pode levar ao surgimento de efeitos indesejados em cerca de 3% dos pacientes. Os mais comuns são a hipoglicemia, alterações hematológicas, como a trombocitopenia, efeitos gastrointestinais e reações alérgicas. Ocorre também aumento de peso, devido aos elevados níveis de insulina no sangue. Além disso, alguns pacientes podem apresentar complicações cardiovasculares, através do agravamento da hipoxemia do miocárdio na doença coronariana (STERI *et al*, 2010).

A limitação do uso das sulfoniluréias podem ocorrer em pacientes com as características como idade menor de 40 anos, presença do DM menos de 5 anos e que apresente peso normal ou baixo. Essas falhas são bastante comuns e podem ocorrer em cerca de 30% dos pacientes. Esses fatores, associados a outros problemas, levam a provocar ainda a diminuição da função da célula pancreática em 48 % dos pacientes (BASHIR *et al*, 2012).

Os inibidores competitivos da alfa-glicosidase são fármacos que atuam antagonizando os efeitos das enzimas da amilase e sucrase e diminuem a absorção intestinal da glicose. Os representantes desses grupos são a acarbose, o miglitol e a voglibose, sendo pouco comuns na iniciação do tratamento do DM. Esses fármacos não interferem na secreção de insulina, e diminuem a glicemia de jejum e a hiperglicemia pós-prandial, além de diminuir os níveis de triglicérides (LIN *et al*, 2012).

A acarbose é o fármaco mais difundido dessa classe, e encontra-se disponível em comprimidos de 50 e 100mg, devendo ser administrada com as refeições. Sua associação com a insulina potencializa o efeito antidiabético, sendo seu efeito hipoglicemiante bem acentuado (TAHARA *et al*, 2012).

Os efeitos colaterais mais comuns do uso dos inibidores de alfa-glicosidase são flatulências, diarreias, dores abdominais, e elevação das transaminases, que têm relação com a dose utilizada e são atenuados com a continuidade. Logo indivíduos com doenças intestinais inflamatórias, gravidez e lactação, insuficiência hepática ou renal grave, não devem fazer uso destes medicamentos (BODMER *et al*, 2010).

Dentre os efeitos benéficos dessa classe de fármacos, podem apresentar: uma diminuição de eventos cardiovasculares, prevenção de diabetes mellitus tipo 2, redução do espessamento médio intimal carotídeo e melhora do perfil lipídico (SBD, 2013).

Os tiazolidíneos são fármacos hipoglicemiantes orais derivados da tiazolidinediona. Encontram-se disponíveis no mercado farmacêutico mundial comercialmente há alguns anos. São exemplos dessa classe de fármacos, a rosiglitazona e a pioglitazona, que são considerados de 2ª geração e atuam sobre a hiperglicemia, aumentando e sensibilizando a ação da insulina no fígado, músculos e adipócitos. Esses fármacos são capazes de ativarem os receptores nucleares intracelulares como o PPAR (receptores ativados por proliferador de peroxissoma). Eles regulam a expressão de genes responsáveis pela captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e que atuam na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (BOGNER *et al*, 2012).

Os tiazolidíneos aumentam a expressão do GLUT4, da lipase, além de reduzirem a expressão da leptina e do TNF-alfa. Inibem também a oxidação de cadeias longas de ácidos graxos no fígado, resultando na inibição da gliconeogênese. Diante disso, esses agentes podem diminuir a progressão da aterosclerose. A redução dos níveis glicêmicos de pacientes diabéticos reflete-se em 20% dos pacientes, porém não ocorre elevação da secreção de insulina. Eles podem apresentar maior efeito potencializador da ação periférica da insulina e menor efeito em diminuir a produção hepática de glicose (BASHIR *et al*, 2012; MINGRONE, *et al* 2012).

Os efeitos colaterais dos tiazolidíneos são bastante comuns e ocorrem em cerca de 5% dos pacientes e caracterizam-se como infecções do trato respiratório superior, cefaléia, elevação de transaminases, edema, aumento de peso e anemia. O uso dos tiazolidíneos pode levar ao surgimento de hipoglicemia, sendo seu uso contra-indicado em crianças, gravidez e hepatopatias (LIGVAY *et al*, 2009).

Esses fármacos são contra-indicados em pacientes que apresentam insuficiência cardíaca classes III e IV, insuficiência hepática e gravidez, dentre os efeitos benéficos, podem ser citados: prevenção de diabetes mellitus tipos 2, redução do espessamento médio intimal carotídeo, melhora do perfil lipídico e redução da gordura hepática (SBD, 2013).

3.8 Plantas medicinais e Fitoterapia

Desde o início da sua existência, o homem tem utilizado as plantas para curar suas doenças. Ao longo do tempo, os povos indígenas, curandeiros e líderes religiosos segurou o conhecimento através das plantas e muitas vezes eles simbolizam a única opção terapêutica para muitas comunidades e grupos étnicos (ARCANJO, 2012).

O uso de plantas medicinais tem origem na tradição familiar, que passa de geração a geração, e é uma prática comum na medicina popular. Nos dias atuais, o uso de produtos de origem natural tem aumentado consideravelmente, entre outros fatores, em virtude do difícil acesso da população à assistência médica, e do alto custo dos medicamentos industrializados (BRASILEIRO *et al*, 2008).

A fitoterapia representa uma alternativa que se adequa a necessidade de vários municípios Brasileiros no que concerne ao atendimento primário à saúde. Essa expansão dos medicamentos fitoterápicos deve-se em parte, aos efeitos adversos provocados pelos fármacos sintéticos, a uma preferência cada vez maior dos usuários por tratamento alternativo a base de plantas medicinais, a uma crescente iniciativa da ciência em conhecer as propriedades farmacológicas das espécies vegetais, além do desenvolvimento de novos métodos analíticos para o controle de qualidade e novas formas de preparação dos medicamentos fitoterápicos, aliados ao baixo custo destes medicamentos (MOREIRA *et al*, 2010).

Segundo Antônio (2014), o uso da fitoterapia tem motivações diversas, tais como aumentar os recursos terapêuticos, resgatar saberes populares, preservar a biodiversidade, fomentar a agroecologia, o desenvolvimento social e a educação ambiental, popular e permanente.

3.9 Espécie botânica em estudo

3.9.1 Taxonomia

Classe: Magnoliopsida
Ordem: Sapindales
Família: Rutaceae
Gênero: *Murraya*
Espécie: *Murraya paniculata*

3.9.2 Sinonímia

Murraya exotica L.; *Chalcas paniculata* L.; *Chalcas exotica* (L.) Millsp.

3.9.3 Nomes populares

Murta-de-cheiro; Dama-da-noite; Laranja-Jasmin; Murta; Murta-da-índia; Murta-dos-jardins.

3.10 Família Rutaceae

A família Rutaceae é constituído por cerca de 1800 espécies, distribuídas em aproximadamente 156 gêneros encontrados em regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, 28 gêneros foram identificadas até agora, incluindo 182 espécies, metabolitos secundários, tais como: alcalóides, cumarinas e lignanas são encontrados nas espécies da família Rutaceae (COSTA *et al.*, 2010).

Rutaceae é uma grande família de árvores, arbustos e trepadeiras reconhecido facilmente pelo cheiro aromático dos galhos ou das folhas esmagadas. Alguns constituintes dos óleos essenciais, como citronela e bergamota, são obtidas por destilação a partir de plantas desta família, e muitas espécies são utilizadas na medicina nativa na Malásia (SUKARI *et al*, 2010).

3.11 *Murraya paniculata*

Figura 2 – *Murraya paniculata*



Fonte: Autor

Murraya paniculata (L.) Jack é uma pequena árvore nativa da família Rutaceae, originária da Ásia e introduzida no Brasil para fins ornamentais há muitos anos sendo vulgarmente conhecida como laranja jasmim. Na Índia ela é distribuída na maior parte do território, sendo considerada nativa da Ásia tropical, as suas folhas são estimulante e adstringente, que são supostamente usadas na forma de uma infusão para o tratamento da diarreia e disenteria nas Filipinas (GAUTAM *et al*, 2012). Um estudo químico desta planta colhida no estado de São Paulo – Brasil, apresentou um perfil químico diferente, quando comparado com os estudos utilizando material vegetal coletado em países asiáticos (SOUSA *et al*, 2008).

Dentre os compostos existentes na espécie *M. paniculata*, podem ser encontrados cumarinas preniladas e flavonóides, além de derivados do ácido cinâmico e alcalóides. Entretanto, trabalhos publicados na literatura científica, ressaltam sobre a existência de uma grande variedade de compostos químicos entre as espécies dessa planta encontrados em diferentes localidades (MESQUITA *et al*, 2008).

Estudos fitoquímicos mostraram a presença de duas novas cumarinas na espécie *M. paniculata*, sendo identificado a (dioxina e a policlorbifenil dioxina) em tecidos vegetais e solos contaminados. Na família Rutaceae, isoflavonóides foram encontrados em *Fortunella obovats* e *M. paniculata*. Uma nova cumarina foi também encontrada em *M. paniculata* com

características estruturais semelhantes a um polissacarídeo solúvel em água (SHARKER *et al*, 2009).

Diversos constituintes químicos como: flavonóides, alcalóides indol, cumarinas, isoflavonóides, óleos essenciais, polissacarídeos e ácidos graxos, foram isolados das diferentes partes dessa planta. Esta espécie vegetal já foi avaliada para diversas atividades farmacológicas, dentre as quais: ação antinociceptiva, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anti-febre reumática e anti-disentérico (GILL NS, KAUR N & ARORA R, 2014).

Além dessas atividades farmacológicas apresentadas, Gautam e colaboradores (2012a) em trabalhos publicados, relataram que o extrato da planta *M. paniculata* apresenta uma atividade hipoglicemiante quando utilizado em modelos de diabetes experimental.

Tradicionalmente folhas desta planta são usadas para analgesia em diferentes partes de Bangladesh, eles costumam usar o extrato de folhas por via oral e relatam aliviar a dor. A espécie cresce como uma planta de floração e as flores têm cheiro doce (SHARKER *et al*, 2009). Segundo Rahmatullah (2014), os praticantes da medicina popular em Bangladesh aconselham ferver as folhas da planta, fazer gargarejos com a água de três a quatro vezes ao dia por três dias para a manutenção de dentes e gengivas saudáveis, além das hastes da planta serem utilizadas para dor de dente.

4. METODOLOGIA

4.1 Material Botânico

As folhas de *Murraya paniculata* utilizadas para realização do extrato vegetal foram coletadas no município de Crato-CE, na primeira quinzena do mês de julho de 2013, entre 8:00 e 9:30 da manhã, no campus da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob as coordenadas geográficas: latitude 7°23'80'',74 S, e longitude 39°41'59'',68 W. O material botânico foi identificado pela Dr^a Maria Arlene Pessoa da Silva e uma exsicata do referido material foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri, sob o número 4301.

4.2 Análise Fitoquímica

A análise Fitoquímica do extrato de *M. paniculata* foi realizada no laboratório de Pesquisa Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brasil.

4.2.1 Produtos químicos, aparelhos e procedimentos gerais

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico. Acetonitrilo, ácido fosfórico, ácido gálico, ácido elágico, ácido clorogênico e ácido cafeico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A catequina, epicatequina, rutina, quercetina, quercitrina, kaempferol e luteolina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi realizada com um amostrador automático Shimadzu proeminência (SIL-20A) sistema de HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT ligados a um DGU 20A5 degaseificador com um CBM 20A integrador, SPD-M20A diodo detector de arranjo e LC solução 1,22 software SP1.

4.2.2 Quantificação de compostos por meio de HPLC-DAD

O extrato Hidroalcolico de *M. paniculata* a uma concentração de 12 mg/ml foi injetada por meio de um amostrador modelo SIL-20A da Shimadzu automático. As separações foram

realizadas utilizando uma coluna Phenomenex C18 (4,6 mm x 250 mm x 5µm tamanho de partícula). A fase móvel foi água com 1% de ácido fosfórico (v/v) (solvente A) e acetonitrilo de grau HPLC (solvente B) a uma taxa de fluxo de 0,7 ml / min e o volume de injeção de 40 µL. O gradiente de composição foi: 5% do dissolvente B, atingindo 15% aos 10 min; 30% de solvente B em 25 min, 65% de solvente B em 40 min e 98% de solvente B em 45 min. Aos 50 minutos o gradiente alcançado as condições iniciais de novo, seguindo o método descrito por MENEZES et al. (2015) com ligeiras modificações. A amostra e a fase móvel foi filtrada através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultra-sons antes da utilização. As soluções stock de referências de normalização foram preparadas em fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,030-0,500 mg / ml. Quantificações foram realizadas por integração dos picos utilizando o método do padrão externo, a 254 nm para o ácido gálico; 280 nm para catequina e epicatequina; 327 para ácido caféico, ácido clorogênico e ácido elágico; e 356 nm rutina, quercitrina, quercetina, kaempferol e luteolina. Cromatografia picos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 600 nm). Todas as operações de cromatografia foram realizados a temperatura ambiente e em triplicata. Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 13072x + 1.264,5$ ($r = 0,9998$); ácido caféico: $Y = 11957x + 1.321,9$ ($r = 0,9996$); ácido clorogênico: $Y = 11893x + 1.280,5$ ($r = 0,9997$); ácido elágico: $Y = 12758x + 1.176,4$ ($r = 0,9998$); catequina: $Y = 13276x + 1194,8$ ($r = 0,9999$); epicatequina: $Y = 13164x + 1293,6$ ($r = 0,9995$); rutina: $Y = 12595x + 1.256,7$ ($r = 0,9997$); kaempferol: $Y = 11893x + 1186,5$ ($r = 0,9996$), luteolina: $Y = 11863x + 1348,9$ ($r = 0,9998$); quercetina: $Y = 12740x + 1265,6$ ($r = 0,9999$) e quercitrina: $Y = 12756x + 1237,1$ ($r = 0,9999$).

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. LOD e LOQ foram calculados como 3,3 e 10 σ/S , respectivamente, onde σ é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração (BOLIGON *et al.*, 2015).

4.3 Drogas

O aloxano utilizado no processo de indução do diabetes, assim como o diazóxido foram adquiridos da *Sigma Chemical Co* (St. Louis, MO, USA), os hipoglicemiantes: glibenclamida e metformina foram adquiridos do *Laboratório Biossintética* (São Paulo, SP, Brasil). O aloxano utilizado no experimento, na concentração (40 mg/Kg) foi preparado minutos antes de cada processo de indução. Pesava-se a droga, adicionava-se água, homogeneizava e transferia a

solução para um recipiente âmbar envolto com papel alumínio, para diminuir o possível processo de fotossensibilização. Posteriormente, administrava-se o aloxano pela veia peniana, via intravenosa (i.v.). Os comprimidos de glibenclamida e metformina eram macerados, em gral e pistilo, dissolvidos em água e administrados por gavagem nas concentrações de 5mg/Kg e 50mg/Kg, respectivamente. O diazóxido (125mg/Kg) foi preparado minutos antes do experimento, pesou-se a substância, em seguida realizou-se a diluição com NaOH 1M e NaCl 0,9% na proporção (4:1), (v.v) respectivamente conforme indicações do fabricante.

4.4 Preparação do extrato vegetal

O extrato Hidroalcolólico das folhas de *Murraya paniculata* (MPE) foi preparado no Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob coordenação do Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa. As folhas de *Murraya paniculata* foram pesadas, lavadas e trituradas com a ajuda de um triturador elétrico para aumentar a superfície de contato, em seguida colocadas para secar ao sol, por um período de 24h. Foi colocado para macerar juntamente com álcool metílico P.A (95° GL) e água (1:1), (v/v), durante três dias. Ao final dos três dias, realizou-se a filtração do extrato com o auxílio de um bécker e papel de filtro. Em seguida, passou-se o extrato em aparelho evaporador rotativo (Fisaton), a (40 rpm, 40 °C) para retirada do etanol, terminado de passar todo o extrato no evaporador rotativo, este foi colocado no banho-maria a 50 °C, por 24 horas para retirar o álcool remanescente do processo anterior. Por fim, o extrato foi congelado e em seguida colocado para liofilizar, procedendo-se a pesagem do pó liofilizado.

4.5 Teste de toxicidade aguda

Foi realizado segundo o teste hipocrático, utilizou-se *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina, machos, adultos pesando entre 200 a 250 g, estes foram divididos em 7 grupos com 3 animais cada (n=3), foi administrado o extrato por via oral (v.o.) nas concentrações de (5, 50, 250, 500, 1000, 2000 (mg/Kg)) e outro grupo tratado com água. Os efeitos foram observados nas primeiras quatro horas e seguidamente analisava-se uma vez ao dia por 14 dias seguidos, baseado nos parâmetros da tabela de Malone. Essa avaliação seguiu a metodologia proposta por Almeida et al., (1999) e consistiu em observar a presença ou não de alterações respiratórias, digestivas e neurológicas com o objetivo de quantificar-se os efeitos destes sobre os parâmetros: 1- Sistema Nervoso Central - SNC a) estimulante (hiperatividade, irritabilidade,

agressividade, tremores, convulsão, piloereção, b) depressora (hipnose, ptose, sedação, ataxia, reflexo de endireitamento, catatonía, analgesia, resposta ao toque diminuída, perda do reflexo corneal, perda do reflexo auricular); c) outros comportamentos (bocejo excessivo, limpeza, levantar, escalar, vocalizar, sacudir a cabeça, contorções abdominais, abdução das patas do trem posterior). 2- Sistema Nervoso Autônomo - SNA (diarréia, constipação, defecação aumentada, respiração forçada, lacrimejamento, micção, salivação, cianose, tono muscular, força para agarrar). 3- Morte.

A quantificação dos efeitos foi observada utilizando o seguinte critério: (0) sem efeito, (-) efeito diminuído; (+): efeito presente e (++): efeito intenso. Os sinais de toxicidade foram definidos de acordo com Almeida *et al.*, (1999) e Brito (1994) e estão descritos no (APÊNDICE A). Ao final calculou-se a Dose Letal Mínima (DL₅₀), com base na quantidade de morte dos animais por grupo.

4.6 Delineamento do estudo

O presente estudo caracterizou-se por ser um estudo experimental, longitudinal com características quantitativas considerado subsídio importante no planejamento das políticas de saúde para as populações (ROUQUAYROL & ALMEIDA FILHO, 1999).

4.7 Período e local do estudo

Os testes com experimentação animal foram realizados no laboratório de Farmacologia e Biofisiologia da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), localizado no referido município do estado do Ceará. O período de realização dos experimentos foi de Outubro de 2013 a Novembro de 2014.

4.8 População e amostra

Foram utilizados *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina, machos, adultos pesando entre 200 a 250 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), mantidos em repouso por no mínimo 24 horas em caixas plásticas forradas com serragem. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente controlado com ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura (22±2 °C) e umidade

(70%), divididos em grupos de 10 animais e sendo distribuídos cinco animais em cada caixa conforme as drogas em estudo.

Os protocolos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri – URCA (Protocolo nº – 00129/2013.2) **ANEXO A.**

4.9 Critérios de inclusão e exclusão da coleta de dados

Grupo em estudo:

- *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina.
- Machos.
- Adultos.
- Pesar entre 200 e 250 g.
- Apresentar glicemia > 250 mg/dL, após indução com aloxano.
- Ser provenientes do Biotério Central da FMJ.

Grupo controle:

- *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar albina.
- Machos.
- Adultos.
- Pesando entre 200 a 250 g.
- Não ser diabético (Controle negativo).
- Apresentar glicemia > 250 mg/dL, após indução com aloxano (Controle positivo).
- Ser provenientes do Biotério Central da FMJ.

4.10 Grupos experimentais

Foram utilizados seis grupos de dez animais cada: sendo três grupos tratados com o extrato de *Murraya paniculata* (MPE) nas concentrações de (100, 200 e 400 mg/Kg), Glibenclamida (5 mg/Kg), Metformina (50 mg/Kg) e um grupo tratado com água destilada.

4.10.1 Marcação e pesagem dos animais

No início do estudo, os animais foram marcados através de pincel atômico na região da cauda e pesados individualmente uma vez por semana no período entre oito e dez horas da manhã. Foi registrado o peso corporal inicial (momento da indução) e durante todo o período do estudo (semanalmente), foi utilizada uma balança da marca Filizola[®], com peso em gramas para a realização da pesagem dos animais.

4.10.2 Tratamento dos animais

Os animais eram tratados todos os dias com as drogas em estudo, sempre no mesmo período da manhã entre (8:00 e 10:00h) e a dose era ajustada conforme a variação do peso médio entre os grupos tratados.

4.11 Indução do diabetes

O diabetes foi induzido em ratos machos Wistar (200-250g) pela administração intravenosa de aloxano (40 mg/kg), através da veia peniana com os animais sob anestesia inalatória em campânula com éter. Após 72 h, coletou-se do plexo retroorbital 1 ml de sangue em tubos contendo gel separador (Vacuette, Brasil), novamente, com os animais sob anestesia inalatória em campânula com éter. O soro foi separado por centrifugação a 5000 rpm, por 10 min, e imediatamente usado nos ensaios bioquímicos. Somente os animais apresentando glicemia igual ou superior a 250 mg/dl, foram submetidos aos tratamentos com as drogas em questão (PACKER *et al.*, 2000).

4.12 Avaliação dos efeitos do extrato de *M. paniculata* e dos fármacos de referência sobre os parâmetros bioquímicos.

4.12.1 Testes pilotos de curta e longa duração

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 - 250 g) divididos em grupos de dez animais. Somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram submetidos a administração diária via oral do Extrato Hidroalcolico de *M. paniculata* (MPE) (100, 200 e 400 mg/kg), dos hipoglicemiantes orais glibenclamida (GLI) (5 mg/kg) e

metformina (MET) (50 mg/kg) e água por 1 e 2 semanas. Uma hora após a última administração os animais foram pesados, o sangue foi coletado e submetido as determinações bioquímicas de: glicose, colesterol total, triglicerídeos e transaminases hepáticas ALT e AST. Após um mês de tratamento foi realizado a dosagem de frutossamina e todas as determinações bioquímicas anteriores e com dois meses de tratamento, realizou-se a dosagem de hemoglobina glicada, seguida da determinação de: glicose, colesterol total, triglicerídeos e transaminases hepáticas ALT e AST.

4.12.2 Potencialização do efeito do extrato de *M. paniculata*

Foram utilizados ratos machos Wistar (200 - 250 g) divididos em grupos de dez animais. Somente os animais que apresentaram glicemia igual ou superior a 250 mg/dL foram submetidos a administração diária das substâncias por via oral, distribuídos em seis grupos tratados: Extrato de *Murraya paniculata* (MPE) (10 mg/kg), glibenclamida (GLI) (2 mg/kg), metformina (MET) (5 mg/kg); um grupo controle (água) e dois grupos tratados com as drogas em associação (MPE 10 mg/Kg + Glibenclamida 2mg/Kg) e (MPE 10 mg/Kg + Metformina 5 mg/Kg), tratados por uma semana. Uma hora após a última administração os animais foram pesados, uma gota de sangue oriunda da cauda do animal foi retirada e analisada com relação ao parâmetro bioquímico de glicose em um glicosímetro do tipo ACCU-CHEK® Active.

4.13 Determinações Bioquímicas

Para realização dos parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total, triglicerídeos e as transaminases hepáticas AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase), frutossamina e hemoglobina glicada foram realizadas segundo métodos enzimáticos padrões (Labtest). **APÊNDICE B.** O sangue para a realização dessas análises era coletado em tubos contendo gel separador (Vacuette, Brasil) após um jejum de no mínimo 8 horas, em seguida o sangue era centrifugado a 10 rpm durante 5 minutos, e o soro utilizado para realização das análises bioquímicas.

4.13.1 Glicose

Foram separados três tubos de ensaio e identificou-se como: branco, teste e padrão. No tubo branco: Adicionou-se 1,0 mL do reagente “1” composto por (Solução tampão 50mmol/L,

pH 7,5; fenol ≥ 1 mmol/L; glicose oxidase ≥ 11000 U/L; peroxidase ≥ 700 U/L; 4-aminoantipirina 290 $\mu\text{mol/L}$; azida sódica 7,5 mmol/L; estabilizadores e surfactantes). No tubo teste, adicionou-se 0,01mL da amostra além de 1,0 mL do reagente “1” e no tubo padrão adicionou-se 0,01mL do padrão (contendo glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico) e 1,0mL do reagente “1”. Misturou-se e foram incubadas em banho maria a 37°C durante 15 minutos. Em seguida, determinou-se as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. Para o cálculo do valor da glicose utilizou-se o cálculo abaixo:

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

4.13.2 Colesterol Total

Foram separados três tubos de ensaio e identificou-se como: branco, teste e padrão. No tubo branco: Adicionou-se 1,0 mL do reagente “1” composto por (tampão 50mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500 $\mu\text{mol/L}$; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500 $\mu\text{mol/L}$; colesterol esterase ≥ 250 U/L; colesterol oxidase ≥ 250 U/L; peroxidase ≥ 1000 U/L). No tubo teste, adicionou-se 0,01mL da amostra além de 1,0 mL do reagente “1” e no tubo padrão adicionou-se 0,01mL do padrão (contendo azida sódica 15 mmol/L) e 1,0mL do reagente “1”. Misturou-se e foram incubados em banho maria a 37°C durante 10 minutos. Em seguida, determinou-se as absorvâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510), acertando o zero com o branco. Para o cálculo do valor do colesterol utilizou-se o cálculo abaixo:

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

4.13.3 Triglicerídeos

Foram separados três tubos de ensaio e identificou-se como: branco, teste e padrão. No tubo branco: Adicionou-se 1,0mL do reagente “1” composto por (tampão 50mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4mmol/L; 4-clorofenol 2,70mmol/L; 4-aminoantipirina 300 $\mu\text{mol/L}$; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lípase ≥ 1400 U/L; glicerolquinase 1000 \geq U/L; glicerolfosfato oxidase ≥ 1500 U/L; peroxidase ≥ 900 U/L e azida sódica 0,095%). No tubo teste adicionou-se 0,01mL da amostra, além de 1,0 mL do reagente “1” e no tubo padrão adicionou-se 0,01 mL do padrão (contendo triglicérides 200mg/dL e azida sódica 0,045%) além de 1,0mL do reagente “1”. Misturou-se e foram incubados em banho maria a 37°C durante 10 minutos. Em seguida,

determinou-se as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. Para o cálculo do valor do triglicerídeo, utilizou-se o cálculo abaixo:

$$\text{Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

4.13.4 AST

Foram separados dois tubos de ensaio e adicionou-se 0,5 mL do substrato AST (contendo 0,2M de L-aspartato, 0,002M Alfa cetogluturato, tampão de fosfatos 0,1M pH 7,4) colocou-se em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Adicionou-se 200µL, homogeneizava e incubava a 37°C, durante 30 minutos. Adicionou-se 0,5 mL de reagente de cor (solução 0,001M de 2,4 dinitrofenilhidrazina), homogeneizou-se e deixou em repouso, à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Adicionou-se 5 mL hidróxido de sódio 0,4M; misturou-se e deixou repousar durante 2 minutos, à temperatura de 20-30°C. Por fim procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 505nm ou filtro verde, acertando o zero com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procurou-se os valores em unidades AST, esses valores eram convertidos conforme a equação abaixo:

$$\text{Transaminases (U.I/L)} = \text{transaminases unidades F.R/ mL} \times 0,482$$

4.13.5 ALT

Foram separados dois tubos de ensaio e adicionou-se 0,5 mL do substrato ALT (contendo 0,2M de L-alanina, 0,002M Alfa cetogluturato, tampão de fosfatos 0,1M pH 7,4) colocou-se em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Adicionou-se 100µL, homogeneizava e incubava a 37°C, durante 30 minutos. Adicionou-se 0,5 mL de reagente de cor (solução 0,001M de 2,4 dinitrofenilhidrazina), homogeneizou-se e deixou em repouso, à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Adicionou-se 5 mL hidróxido de sódio 0,4M; misturou-se e deixou repousar durante 2 minutos, à temperatura de 20-30°C. Por fim procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em 505nm ou filtro verde, acertando o zero com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procurou-se os valores em unidades ALT, esses valores eram convertidos conforme a equação abaixo:

$$\text{Transaminases (U.I/L)} = \text{transaminases unidades F.R/ mL} \times 0,482$$

4.13.6 Frutosamina

Primeiro procedeu-se a preparação do reagente de trabalho, misturando o conteúdo do frasco de reagente “2” com o frasco de reagente do tubo “1” homogeneizando-o por inversão. Para preparação do calibrador, dissolveu-se o conteúdo do frasco de calibrador (Nº 3) em 2 mL de água destilada, esperou-se 30 minutos antes de misturar por inversão. Foram identificados 2 tubos de ensaio como teste e calibrador e colocou-se 1 mL do reagente de trabalho em cada tubo, incubou-se a 37°C durante 2 minutos. Em seguida adicionou-se 0,05 mL da amostra no tubo teste e 0,05 mL do calibrador no tubo identificado como calibrador. Misturou-se bem e incubou-se a 37°C. Após exatamente 10 minutos determinou-se as absorvâncias (A1) do teste e do calibrador em 530 nm (510-550), acertando o zero com água destilada. Em seguida continuou a incubação a 37°C por mais exatamente 5 minutos e determinou-se as absorvâncias (A2) do teste e do calibrador em 530 nm (510-550), acertando o zero com água destilada, para o cálculo da frutosamina, utilizou-se a equação abaixo:

$$\text{Frutosamina } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{Absorvância (A2 - A1) teste}}{\text{Absorvância (A2 - A1) calibrador}} \times \text{Conc. Calibrador, em que:}$$

A1 e A2 teste: Absorvâncias do Teste

A1 e A2 calibrador: Absorvâncias do Calibrador

4.13.7 Hemoglobina glicada

Primeiro procedeu-se a preparação do hemolisado, em um tubo de ensaio adicionou-se 0,4 mL do hemolisante (nº 2) e 0,1 mL da amostra. Agitou-se fortemente por 20 segundos e esperou-se 5 minutos. Após essa etapa, centrifugou-se o hemolisado e usou o sobrenadante. Para preparação da coluna, retirou-se a tampa superior da coluna, introduziu-se o bastão fazendo movimentos giratórios descendentes e ascendentes para ressuspender a resina. Removeu-se imediatamente a tampa inferior e colocava a coluna em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 0,05 mL do hemolisado sobre a resina, de modo que não houvesse ressuspensão da mesma, evitando a formação de bolhas de ar, esperando que todo o hemolisado penetre na resina. Transferiu-se a coluna para um tubo de ensaio marcado com o número “1” e adicionou-se lentamente com a ponta da pipeta tocando a parede da coluna, 3,5 mL de Tampão Hb-Rápida (nº 1), a eluição da Hb-G completou-se após todo o tampão penetrar na resina. Na parte colorimétrica, homogeneizou-se o conteúdo do tubo número “1” (Hb-G) e usou-o para a colorimetria sem qualquer tratamento adicional. Em um tubo de ensaio identificado com o

número “2” (Hb-Total), pipetou-se 7 mL de água deionizada, adicionou-se 0,02 mL do hemolisado e misturava-os. Por fim foram determinadas as absorvâncias dos tubos de número “1” (Hb-G) e número “2” (Hb-Total) em 415 nm ou filtro azul (405 a 430) acertando o zero com água destilada. Para o cálculo da hemoglobina glicada, usou-se a equação abaixo:

$$\text{Hemoglobina Glicada (\%)} = \frac{A1}{5 \times A2} \times 100, \text{ em que:}$$

A1: Absorvância do tubo “1” (Hb-G)

A2: Absorvância do tubo “2” (Hb-Total)

4.14 Investigação do mecanismo de ação via bloqueio de canais de K⁺ ATP-dependentes na hiperglicemia induzida por diazóxido (DZD)

Os ensaios foram realizados de acordo com estudos de LEAHY *et al.*, 1994; ZHAO *et al.*, 2005. Grupos de seis ratos machos, Wistar, pesando entre 200 e 250 gramas foram utilizados e divididos em três grupos (Controle Normal, MPE 100 mg/Kg e GLI 5 mg/Kg), após uma hora de tratados, o diazóxido (DZD) 125 mg/Kg foi administrado por via intraperitoneal. Uma gota de sangue oriunda da cauda dos animais foi retirada e analisada com relação ao parâmetro bioquímico de glicose em um glicosímetro do tipo ACCU-CHEK® Active nos tempos zero (antes da aplicação do DZ), 60, 120 e 180 minutos após a aplicação.

4.15 Avaliação histopatológica dos rins, fígado e pâncreas

Foi realizada a análise morfológica dos órgãos dos grupos: controle negativo (ratos não diabéticos), ratos diabéticos (controle positivo), dos grupos tratados com o extrato de *Murraya paniculata* (MPE) (100, 200 e 400 mg/kg), dos grupos tratados com glibenclamida (GLI) (5 mg/Kg) e metformina (MET) (50mg/kg), ao final do experimento, os animais foram anestesiados por inalação em éter e seus órgãos foram retirados e mantidos em frasco de vidro, contendo formalina tamponada (pH 7,4) durante 3 dias. Em seguida submetidos ao processamento histológico para preparação das lâminas. Os fragmentos dos segmentos, fixados em formalina tamponada foram desidratados por uma bateria de álcool etílico com concentração crescente (70%, 80%, 90% e álcool absoluto), diafanizados em xilol, emblocados em parafina e cortados por micrótomo, em cortes com espessura de 5 mm. As secções obtidas foram secadas em estufa a 37°C e coradas com hematoxilina e eosina.

4.16 Métodos estatísticos

A análise estatística foi realizada através do software v6.0 Prism TM (GraphPad [®] Software, San-Diego, Califórnia, EUA) e os resultados foram apresentados como médias \pm EPM e os dados analisados através de ANOVA e do teste de Tukey como teste *post hoc*. Quando necessário utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Perfil químico

Foram obtidos 3906g de folhas secas de *Murraya paniculata*, que posteriormente foram submetidas a extração com água e álcool (1:1); (v.v). Em seguida essa mistura foi filtrada para eliminação de resíduos sólidos, e o filtrado foi concentrado em evaporador rotativo, para posterior liofilização. Ao término desse processo, obteve-se 215,69g, o que representou um rendimento de 5,52%.

A análise fitoquímica do extrato hidroalcolólico de *M. paniculata* revelou a presença de ácido gálico (tempo de retenção - t_R = 10,05 min; pico 1), catequina (t_R = 12,73 min; pico 2), o ácido clorogênico (t_R = 17,96 min; o pico 3), cafeico ácido (R = 19,34 min; pico 4), ácido elágico (t_R = 22,45 min; pico 5), epicatequina (t_R = 25,79 min; pico 6), a rutina (t_R = 33,68 min; pico 7), quercitrina (t_R = 37,11 min; pico 8), a quercetina (t_R = 39,65 min; pico 9), campferol (t_R = 43,57 min; pico 10) e luteolina (t_R = 46,93min; pico 11) (Figura 1 e Tabela 1).

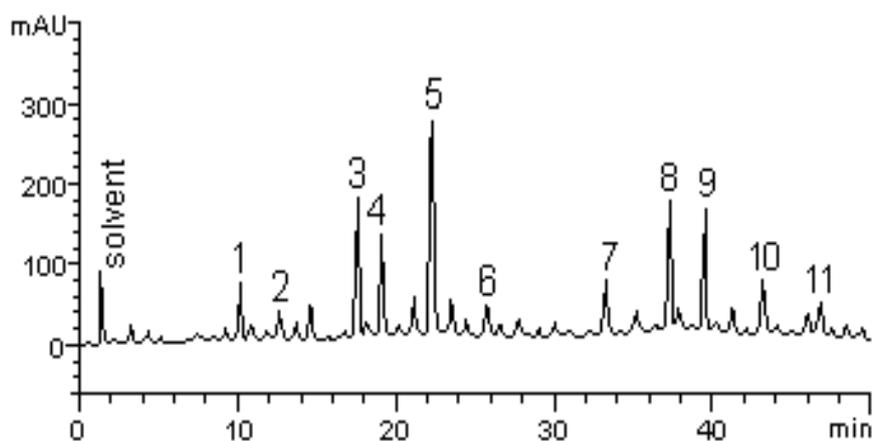


Figura 3. Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência representante de *Murraya paniculata*. O ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido caféico (pico 4), ácido elágico (pico 5), epicatequina (pico 6), a rutina (pico 7), quercitrina (pico 8), quercetina (pico 9), kaempferol (pico 10) e luteolina (pico 11).

Tabela 1. Composição do extrato hidroalcoólico de *M. paniculata*

Composição	<i>M. paniculata</i>	LOD	LOQ
	mg/g	µg/mL	µg/mL
Ácido gálico	5.18 ± 0.03 a	0.023	0.076
Catequina	2.05 ± 0.01 b	0.011	0.036
Ácido clorogênico	9.93 ± 0.01 c	0.018	0.059
Ácido cafeico	8.06 ± 0.04 d	0.009	0.030
Ácido elágico	14.11 ± 0.02 e	0.020	0.066
Epicatequina	1.98 ± 0.01 b	0.015	0.049
Rutina	5.07 ± 0.03 a	0.007	0.023
Quercitrina	9.83 ± 0.01 c	0.026	0.085
Quercetina	9.46 ± 0.01 c	0.013	0.043
Kaempferol	5.09 ± 0.02 a	0.008	0.026
Luteolina	1.97 ± 0.03 b	0.019	0.063

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey $p < 0,05$. LOD: Limite de detecção e LOQ: limite de quantificação.

Estes compostos também foram observados em trabalhos de MESQUITA e colaboradores (2008) que demonstraram a presença de alcaloides e flavonoides.

O extrato de *M. paniculata* contém hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos e compostos fenólicos (GAUTAM *et al.*, 2012a), fitoesterol e cumarinas (ITO *et al.*, 2005; MESQUITA *et al.*, 2008), alcalóides e flavonóides (ALITHEEN, 2012), e derivados de flavona (LU *et al.*, 2012), além de ácido gálico, catequinas, rutina e quercetina (MENEZES *et al.*, 2014).

5.2 Teste de toxicidade aguda

Antes de iniciar os estudos de diabetes induzido por aloxano, o estudo buscou avaliar a toxicidade do MPE via *screening* hipocrático, ensaio de triagem prévia, útil na avaliação das atividades fármaco-toxicológicas (LUCIO *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2009).

Nas doses testadas do MPE, incluindo a mais alta, (2000 mg/kg), nenhum dos animais apresentou mortalidade, assim como nenhum efeito de toxicidade nas primeiras 24 horas após a administração e durante todo o período de estudo. Com estes resultados, observou-se que a toxicidade oral aguda do MPE é maior que 2000 mg/kg e classificada como categoria 5. Segundo o Guia 423 (OECD, 1996) a amostra é considerada praticamente atóxica quando apresenta um valor de DL50 acima de 2000mg/kg ou entre 2000 e 5000mg/kg.

Esses achados são compatíveis com o estudo de toxicidade aguda realizado por Gautam e colaboradores (2012), em que não se observou sinais de toxicidade e morte, após a administração do MPE em ratos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Menezes et al (2014), em que no grupo tratado com a dose de 2000 mg/Kg do extrato de *M. paniculata*, não observou morte de nenhum animal, nem alterações comportamentais significativas.

Estudos realizados por Temburne e colaboradores (2009), em que avaliou-se a toxicidade aguda de *M. koenigii* (L) em camundongos, não foi observado alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e comportamentais ao longo do experimento.

Conforme verificou-se o baixo potencial tóxico da planta, o passo seguinte foi avaliar se ratos diabéticos submetidos ao extrato hidroalcolico das folhas de *M. paniculata* apresentariam alterações no peso e nos parâmetros bioquímicos de: glicemia, triglicerídeos, colesterol total, ALT e AST durante todo o período de tratamento.

5.3 Ganho ou redução do peso

O ganho ou redução ponderal do peso para cada esquema de tratamento foi registrado no período de tratamento de até oito semanas. Os pesos, em gramas, de todos os ratos formadores de cada grupo de tratamento foram medidos no dia zero (T0 – início do tratamento) e no fim de cada período de tratamento (1 semana, 2 semanas, 4 semanas e 8 semanas)

A variação no peso corporal dos animais diabéticos tratados com MPE 100, MPE 200, MPE 400, GLI5, MET50 e água (CD), durante os períodos experimentais, é demonstrada na Figura 4. Percebe-se que na primeira semana existiu uma redução de peso para os ratos tratados com MPE100, MPE200, GLI5, MET50 e CD não tratado, sendo mais acentuada para o CD não tratado 14,24% (223,20g \pm 2,13 para 191,40 \pm 2,08). O grupo tratado com MPE400, diferentemente dos grupos anteriores, obteve ganho ponderal de 2,40% (250,0 \pm 9,89 para 256,0 \pm 7,82) (Figura 4).

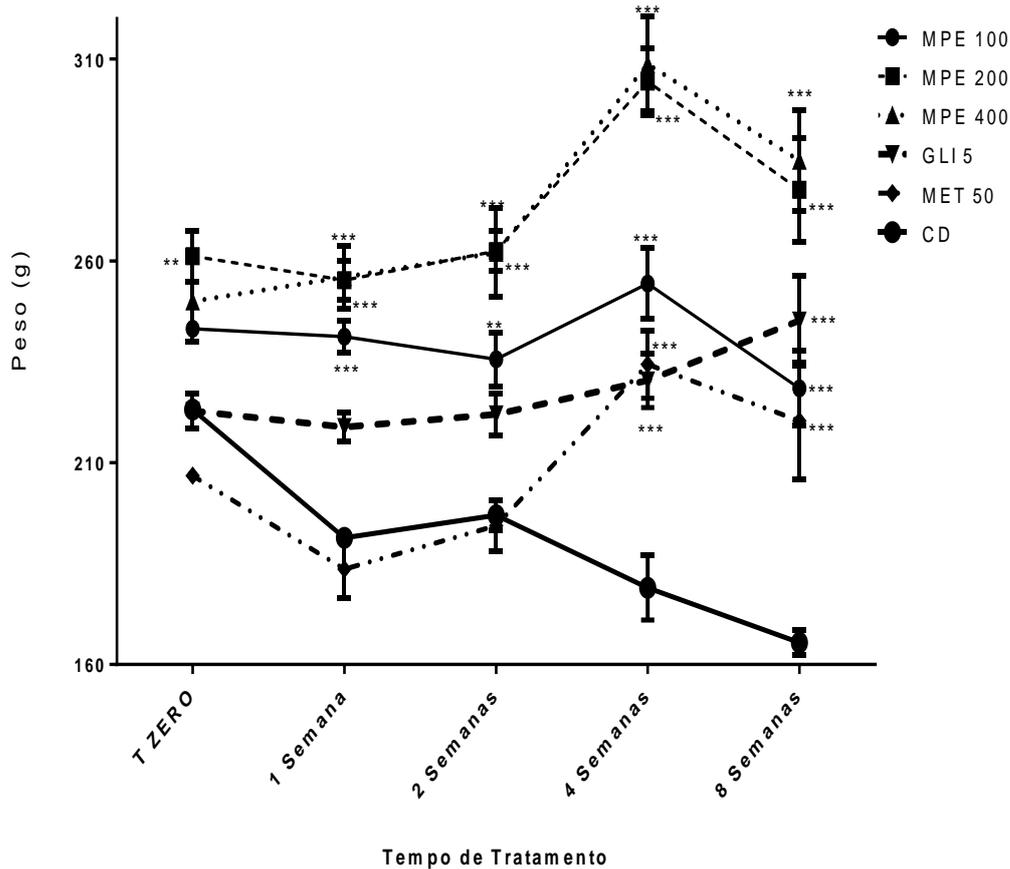


Figura 4. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de *Murraya paniculata* sobre o peso em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 5mg/kg (GLI5), metformina na dose de 50 mg/kg (MET50) ou extrato de *M. paniculata* nas doses 100 mg/kg (MPE 100), 200 mg/kg (MPE 200) ou 400 mg/kg (MPE 400). Os pontos representam a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Após os dois meses de tratamento tem-se o seguinte quadro de perdas e ganhos ponderais; MPE 100 com perda de 6% ($243,20 \pm 1,85$ para $228,40 \pm 9,30$), MPE 200 com ganho de 6,27% ($261,2 \pm 6,24$ para $277,6 \pm 12,89$), MPE 400 com ganho de 13,92% ($250,00 \pm 9,89$ para $284,80 \pm 12,56$), GLI5 com ganho de 10,05% ($222,8 \pm 4,40$ para $245,2 \pm 11,09$), MET50 com ganho de 14,55% ($192,4 \pm 7,41$ para $220,4 \pm 14,51$) e o controle diabético (água) com perda de 25,89% ($223,2 \pm 2,13$ para $165,40 \pm 3,07$) (Tabela 2).

A análise estatística do peso corporal (Teste de Tukey) demonstrou que os grupos MPE 200 e MPE 400 não possuem diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0,05$).

A perda de peso no animal diabético é uma característica associada à condição patológica, devido a um aumento do catabolismo muscular (RAVI *et al.*, 2004). Os ratos diabéticos apresentaram um aumento significativo da glicemia com a concomitante redução de peso dos animais.

Tabela 2. Variação do peso corporal dos animais ao longo do tempo de tratamento. Significativo após análise estatística Teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$)

	T ZERO	1 Semana	2 Semanas	4 Semanas	8 Semanas
CD	223.2±2.13	191.4±2.08	197.0±3.82	179.0±7.96	165.4±3.07
MPE 100	243.2±1.85	241.2±4.07***	235.6±6.67**	254.4±8.77***	228.4±9.30***
MPE 200	261.2±6.24**	255.2±4.84***	262.4±4.91***	304.4±8.28***	277.6±12.89***
MPE 400	250.0±9.89	256.0±7.82***	262.0±10.99***	308.8±11.74***	284.8±12.56***
GLI 5	222.8±4.40	218.8±3.61	222.0±5.09	230.4±6.73***	245.2±11.09***
MET 50	206.8±7.41	183.6±7.25	194.4±6.21	234.4±8.44***	220.4±14.51***

Os valores representam médias±EPM para a variação do peso corporal (n=5). Número de animais especificados em parêntese. MPE 100=extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE 200=extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE 400=extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI 5=glibenclamida 5 mg/Kg; MET50=metformina 50 mg/Kg; CD=controle diabético. Tempo zero (1, 2, 4 e 8) semanas de tratamento.

5.4 Considerações sobre o experimento

No presente estudo, a indução do diabetes com aloxano foi considerado o modelo para avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Murraya paniculata* a curto e a longo prazo. Segundo alguns autores o diabetes induzido por aloxano pode ser permanente, como observado no estudo em que o diabetes persistiu por 2 a 8 meses em coelhos, ratos, cachorros e carneiros (DUFF & STARR, 1944; HOUSSAY *et al.*, 1946; CURTIS *et al.*, 1974; ZHAO *et al.*, 1987).

Como drogas hipoglicemiantes clássicas foram usadas a glibenclamida, um secretagogo de insulina, que causa hipoglicemia principalmente por estimular a liberação de insulina das células pancreáticas (DAVIS, 2006) e a metformina, uma biguanida que melhora o controle glicêmico, aumentando principalmente a sensibilidade hepática (por meio da supressão da glicogenólise e inibição da gliconeogênese no fígado) (WIERNSPERGER & BAILEY, 1999).

Percebe-se também até as primeiras 72 horas após a indução do diabetes com aloxano, embora não registrado neste trabalho, uma maior mortalidade dos grupos, fato que pode ser atribuído a brusca hipoglicemia inicial decorrente da liberação maciça de insulina das células beta destruídas e a posterior hiperglicemia severa pela ausência da insulina.

5.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Glicose

A administração oral do Extrato de *Murraya paniculata* (MPE) reduziu significativamente a hiperglicemia (mg/dL) causado pelo aloxano nos ratos diabéticos após uma semana de tratamento, nas doses de 100mg/Kg *** $p < 0,001$ na ordem de 57,55% (301,8 \pm 1,90 para 128,1 \pm 8,93), 200 mg/Kg reduziu na ordem 42,49% (285,0 \pm 11,12 para 162,7 \pm 26,82), ** $p < 0,01$ (Figura 2). Na dose de 400 mg/Kg a redução foi na ordem de 50,54% (284,3 \pm 8,34 para 140,6 \pm 15,85) *** $p < 0,001$. As drogas de referência também apresentaram reduções significativas *** $p < 0,001$, a glibenclamida 48,56% (292,6 \pm 5,34 para 150,5 \pm 19,76) e a metformina 37,94%(281,7 \pm 12,50 para 174,8 \pm 12,39). O controle diabético manteve a hiperglicemia (309,8 \pm 5,13 para 378,9 \pm 9,80) conforme expresso na Tabela 3.

Gautam e colaboradores (2012a) reportam em seus achados que, após o tratamento de uma semana a ratos diabéticos com o MPE nas concentrações de (100, 200 e 400 mg/Kg), observou-se que apenas o grupo tratado com MPE na concentração de 400 mg/Kg, apresentou redução significativa dos níveis glicêmicos em relação ao grupo controle, assim como o grupo tratado com glibenclamida.

El-Amin e colaboradores (2013) ao estudar o efeito hipoglicemiante de outra planta do gênero *Murraya*, verificou que o extrato da planta *M. koenigii* em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, apresentaram uma redução significativa após uma semana de tratamento nos grupos tratados com o extrato nas concentrações de (100 e 200 mg/Kg).

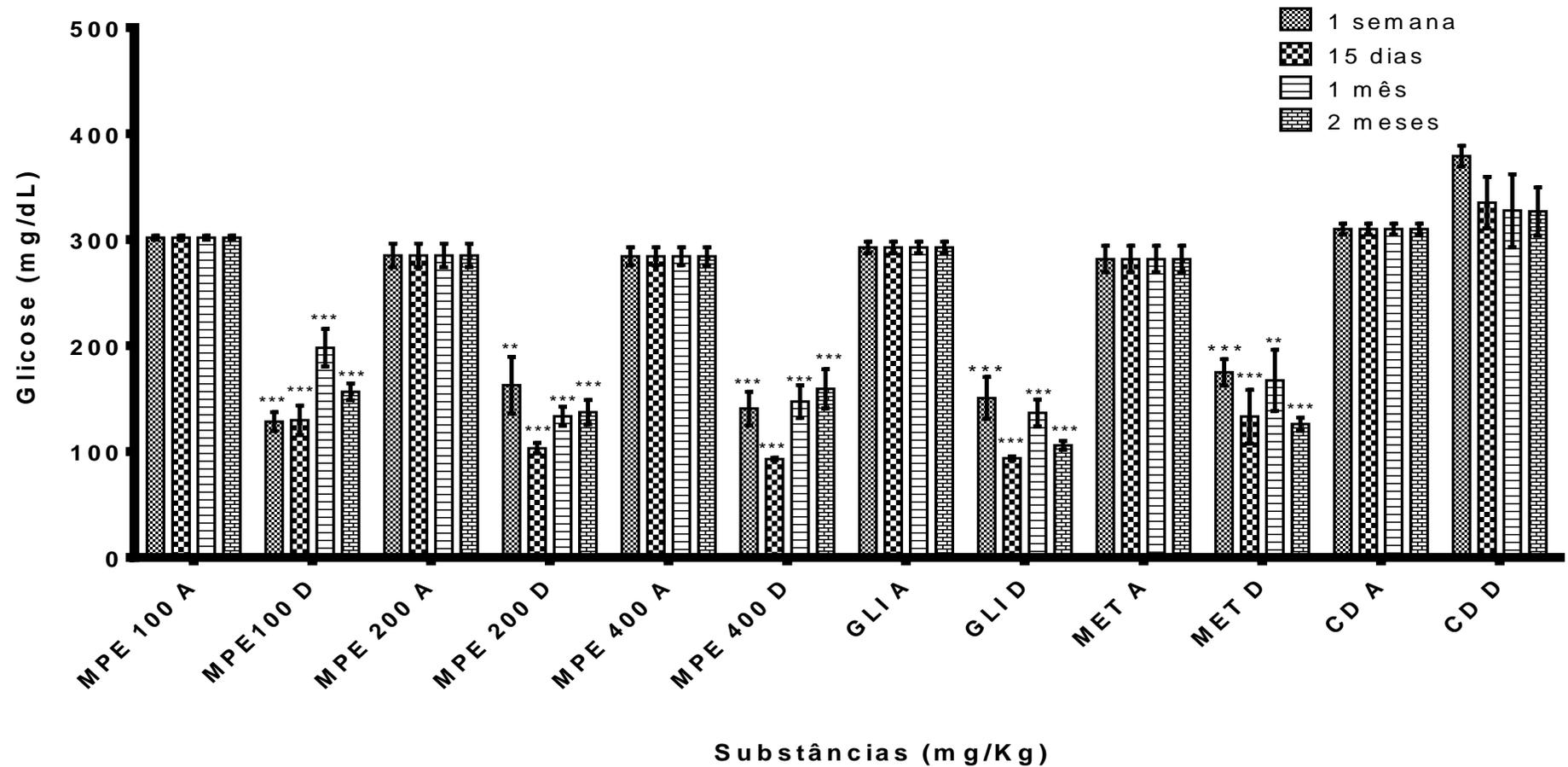


Figura 5. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de *M. paniculata* sobre a glicemia plasmática em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 5mg/kg (GLI5), metformina na dose de 50 mg/kg (MET50) ou extrato de *Murraya paniculata* nas doses 100 mg/kg (MPE 100), 200 mg/kg (MPE 200) ou 400 mg/kg (MPE 400). (n=6). As médias dos grupos tratados D (Após tratamento) foram comparadas com o grupo A (antes do tratamento) e foram consideradas significativamente diferentes para (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001), ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Tabela 3. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis de glicose plasmática, em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia 1 Semana Média ± EPM (mg/dL)	Glicemia 15 dias Média ± EPM (mg/dL)	Glicemia 1 mês Média ± EPM (mg/dL)	Glicemia 2 meses Média ± EPM (mg/dL)
MPE 100 A	301.8 ± 1.90	301.8 ± 1.90	301.8 ± 1.90	301.8 ± 1.90
MPE 100 D	128.1 ± 8.93***	129.5 ± 13.91***	198.0 ± 17.72***	156.4 ± 7.92***
MPE 200 A	285.0 ± 11.12	285.0 ± 11.12	330.9 ± 24.51	285.0 ± 11.12
MPE 200 D	162.7 ± 26.82**	103.2 ± 4.91***	133.3 ± 9.00***	137.1 ± 11.63***
MPE 400 A	284.3 ± 8.34	284.3 ± 8.34	284.3 ± 8.34	284.3 ± 8.34
MPE 400 D	140.6 ± 15.85***	93.02 ± 1.08***	147.3 ± 15.50***	159.2 ± 18.41***
GLI 5 A	292.6 ± 5.34	292.6 ± 5.34	292.6 ± 5.34	292.6 ± 5.34
GLI 5 D	150.5 ± 19.76***	93.67 ± 1.64***	136.6 ± 12.58***	105.9 ± 4.21***
MET 50 A	281.7 ± 12.50	281.7 ± 12.50	281.7 ± 12.50	281.7 ± 12.50
MET 50 D	174.8 ± 12.39***	133.0 ± 25.22***	167.1 ± 28.89**	125.9 ± 6.07***
CD A	309.9 ± 5.13	309.9 ± 5.13	309.9 ± 5.13	309.9 ± 5.13
CD D	378.9 ± 9.80	335.0 ± 24.26	327.4 ± 34.35	326.6 ± 22.75

Os valores representam médias±EPM para os níveis de glicemia (n=6). Número de animais especificados em parêntese. MPE 100=extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE 200=extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE 400=extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI 5=glibenclamida 5 mg/Kg; MET50=metformina 50 mg/Kg; CD=controle diabético. A=antes do tratamento e D=depois do tratamento.

A glicose plasmática dos animais tratados por duas semanas apresentou uma diminuição significativa em relação a análise de uma semana (Figura 5). O grupo tratado com MPE 100mg/Kg reduziu o valor da glicemia na ordem de 57,09% ($301,8 \pm 1,90$ para $129,5 \pm 13,91$), *** $p < 0,001$; MPE 200 mg/Kg reduziu 63,78% ($285,0 \pm 11,12$ para $103,2 \pm 4,91$), *** $p < 0,001$; o MPE 400 mg/Kg, reduziu o valor da glicemia na ordem de 67,28% ($284,3 \pm 8,34$ para $93,02 \pm 1,08$), *** $p < 0,001$, de forma semelhante ao grupo tratado com glibenclamida a redução foi na ordem de 67,98% ($292,6 \pm 5,34$ para $93,67 \pm 1,64$), *** $p < 0,001$. O grupo diabético apresentou um aumento nos valores glicêmicos, passando de ($309,9 \pm 5,13$ para $335,0 \pm 24,26$).

Os resultados encontrados nesse estudo corroboram com os achados de Gautam et al, (2012a) sobre a avaliação glicêmica para ratos diabéticos quando tratados com o extrato de *M. paniculata*, em que estes verificaram que os grupos tratados com o MPE nas concentrações de 200 e 400 mg/Kg, conseguiram reduzir significativamente os níveis glicêmicos ao longo de duas semanas de tratamento.

Um efeito hipoglicemiante semelhante após treze dias de administração do extrato de *Murraya koenigii* foi relatado por El-Amin e colaboradores (2013), em que os grupos tratados com o extrato nas concentrações de (100 e 200mg/Kg), apresentaram uma redução significativa nos níveis glicêmicos.

Com base na Tabela 3, podemos observar os valores plasmáticos de cada grupo tratado relativo a concentração plasmática de glicose. Todos os grupos tratados com MPE, obtiveram reduções dos níveis glicêmicos semelhantes aos grupos tratados com as drogas hipoglicemiantes clássicas glibenclamida e metformina. A administração oral de MPE, nas diferentes doses estudadas, reduziu com a mesma intensidade os níveis glicêmicos dos ratos diabéticos. A MPE na dose 100mg/Kg durante um mês reduziu a hiperglicemia induzida por aloxano nos ratos na ordem 34,39% ($301,8 \pm 1,90$ para $198,0 \pm 17,72$) *** $p < 0,001$. A MPE na dose 200mg/Kg apresentou uma redução semelhante, na ordem de 59,71% ($330,9 \pm 24,51$ para $133,3 \pm 9,00$) *** $p < 0,001$ e a MPE na dose 400mg/Kg obteve uma redução de 48,18% ($284,3 \pm 8,34$ para $147,3 \pm 15,50$) *** $p < 0,001$. O controle diabético teve os seus valores glicêmicos aumentados em 5,64% ($309,9 \pm 5,13$ para $327,4 \pm 34,35$).

Achados de Gautam e colaboradores (2012b), mostraram que, em experimento realizado com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, tratados com o extrato de *M. paniculata* ao longo de 21 dias, apresentaram reduções significativas nos níveis de glicose plasmática, para os grupos tratados com MPE nas concentrações de 200 e 400mg/Kg, assim como o grupo tratado com glibenclamida.

Subramanian & Arulselvan (2007), em experimentos realizados ao longo de um mês de tratamento com o extrato da planta *Murraya koenigii* em ratos diabéticos, observaram uma redução significativa nos níveis glicêmicos destes animais, quando tratados com o extrato dessa planta na concentração de 200 mg/Kg, assim como o grupo tratado com a droga clássica glibenclamida.

Resultados semelhantes foram encontrados por Jayakumar & Ganesh (2012), ao estudar o efeito hipoglicemiante da planta *Murraya koenigii* em ratos diabéticos induzidos por aloxano, estes verificaram que os grupos tratados com o extrato na concentração de (100 e 200mg/Kg), assim como o grupo tratado com glibenclamida, reduziram significativamente os níveis glicêmicos ao longo de um mês de tratamento.

Em um outro estudo, realizado por Kesari *et al* (2007), com ratos diabéticos, após um mês de tratamento com o extrato da planta *Murraya koenigii* na concentração de 300 mg/Kg, observou-se uma redução significativa nos níveis glicêmicos desses animais tratados com o extrato dessa planta.

Após dois meses de administração do extrato MPE e das drogas clássicas metformina e glibenclamida aos animais diabéticos, observou-se os seguintes valores, conforme consta na Tabela 2. Os níveis glicêmicos apresentam reduções significativas, *** $p < 0,001$ nos três grupos tratados. MPE 100mg/Kg reduziu na ordem de 48,17% ($301,8 \pm 1,90$ para $156,4 \pm 7,92$), MPE 200mg/Kg 51,89% ($285,0 \pm 11,12$ para $137,1 \pm 11,63$) e MPE 400 mg/Kg 44,00% ($284,3 \pm 8,34$ para $159,2 \pm 18,41$). Os grupos tratados com metformina e glibenclamida também apresentaram o mesmo perfil de redução, *** $p < 0,001$; glibenclamida 63,80% ($292,6 \pm 5,34$ para $105,9 \pm 4,21$) e metformina 55,30% ($281,7 \pm 12,50$ para $125,9 \pm 6,07$). Em contrapartida o controle diabético aumentou os seus valores glicêmicos na ordem de 5,35% ($309,9 \pm 5,13$ para $326,6 \pm 22,75$), embora não sendo considerado estatisticamente significativo (Tabela 3).

Esses resultados encontrados referentes a dois meses de tratamento com o MPE, não foram confrontados com a literatura devido serem parte do primeiro estudo em que se avalia as ações do tratamento do extrato de *M. paniculata* a longo prazo em modelo de diabetes experimental usando o aloxano.

5.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Triglicerídeos

A Figura 6 mostra a análise da concentração de triglicerídeos ao longo de todo o experimento, foi registrado que após uma semana de tratamento, o extrato de MPE na dose de 100 mg/Kg reduziu significativamente os valores de triglicerídeos plasmáticos em comparação as outras doses analisadas do mesmo extrato, na ordem de 70,30% ($501,7 \pm 57,31$ para $149,0 \pm 20,10$), *** $p < 0,001$. Esses resultados são comparáveis a redução mostrada pelas drogas clássicas metformina 84,20% ($488,3 \pm 43,48$ para $77,12 \pm 4,92$), *** $p < 0,001$ e glibenclamida 48,96% ($319,2 \pm 40,27$ para $162,9 \pm 7,49$), ** $p < 0,01$.

Ao término de 15 dias de tratamento, nos ratos tratados com MPE 100mg/Kg, observou-se uma redução significativa dos valores de triglicerídeos, 65,13% ($501,7 \pm 57,31$ para $174,9 \pm 7,02$), *** $p < 0,001$. Os grupos tratados com glibenclamida e metformina apresentaram reduções estatisticamente significativas, *** $p < 0,001$, sendo que o grupo tratado com glibenclamida reduziu na ordem de 63,72% ($319,2 \pm 40,27$ para $115,8 \pm 15,96$) e o tratado com metformina reduziu 76,77% ($488,3 \pm 43,48$ para $113,4 \pm 20,44$).

Os dados encontrados nesse trabalho são compatíveis com os achados de Gautam e colaboradores (2012a), em que ratos diabéticos induzidos por aloxano, após 14 dias de tratamento, reduziram significativamente os níveis de triglicerídeos plasmáticos, nos grupos tratados com MPE nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg.

Ao longo de um mês de tratamento os valores de triglicerídeos encontrados foram: MPE 100mg/Kg reduziu os valores na ordem de 75,60% ($501,7 \pm 57,31$ para $122,4 \pm 6,48$)*** $p < 0,001$, assim como MPE 200mg/Kg 62,18% ($311,8 \pm 68,96$ para $117,9 \pm 20,47$), * $p < 0,05$ e MPE 400 mg/Kg 76,74% ($456,5 \pm 78,06$ para $107,3 \pm 10,09$), ** $p < 0,01$. Os grupos tratados com as drogas clássicas apresentaram reduções igualmente significativas, o tratado com glibenclamida 78,14% ($319,3 \pm 40,27$ para $69,77 \pm 6,82$), *** $p < 0,001$; a metformina reduziu na ordem de 84,85% ($488,3 \pm 43,48$ para $73,93 \pm 8,51$), *** $p < 0,001$. Enquanto que o controle diabético apresentou um aumento nos níveis de triglicerídeos plasmáticos na ordem de 9,35% ($258,8 \pm 8,22$ para $283,0 \pm 23,67$) (Tabela 4).

Gautam e colaboradores (2012b), ao estudar ratos diabéticos tratados com MPE (100, 200, 400 mg/Kg) e glibenclamida, mostraram que ao final de 21 dias de tratamento, os grupos tratados com glibenclamida e MPE 400mg/Kg, reduziram significativamente os níveis de triglicerídeos plasmáticos em relação ao grupo controle.

Kesari e colaboradores (2007), em seus estudos com o extrato da planta *Murraya koenigii*, após um mês de tratamento, relataram uma diminuição significativa nos níveis de triglicerídeos plasmáticos, no grupo de animais tratados com o extrato dessa planta.

Os níveis de triglicerídeos plasmáticos foram reduzidos em todos os grupos tratados com o extrato MPE. MPE 100mg/Kg 75,10% ($501,7 \pm 57,31$ para $124,9 \pm 4,74$), *** $p < 0,001$; MPE 200mg/Kg 53,72% ($311,8 \pm 68,96$ para $144,3 \pm 16,28$), * $p < 0,05$ e MPE 400 mg/Kg 70,17% ($456 \pm 78,06$ para $136,0 \pm 12,98$), ** $p < 0,01$. Os resultados acima mostram-se semelhantes aos resultados encontrados nas drogas hipoglicemiantes clássicas. Metformina 75,44% ($488,3 \pm 43,48$ para $119,9 \pm 7,16$), *** $p < 0,001$ e glibenclamida 57,39% ($319,2 \pm 40,27$ para $136,0 \pm 12,98$), ** $p < 0,001$. Esses dados não foram confrontados com a literatura, por ser parte do primeiro estudo que avalia as ações do MPE a longo prazo.

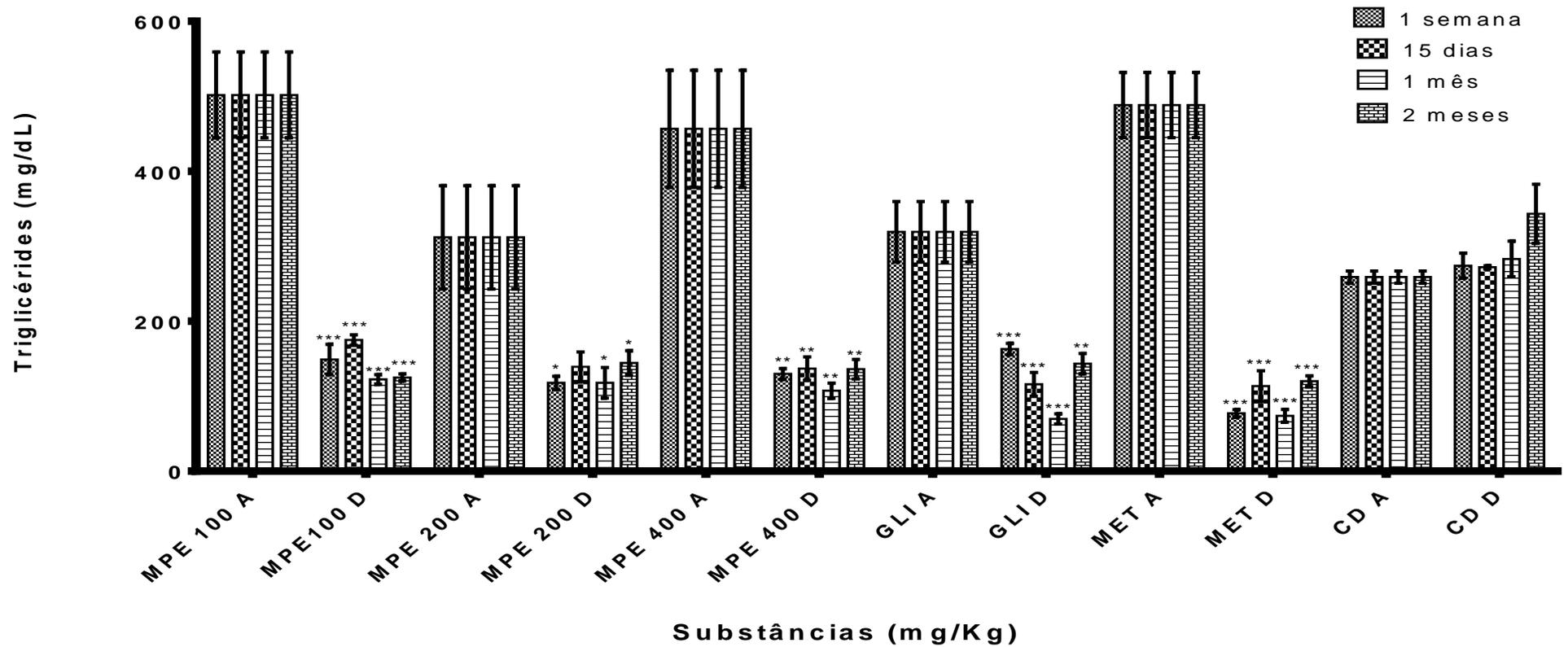


Figura 6. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de *M. paniculata* sobre os valores de triglicérides plasmático em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 5mg/kg (GLI5), metformina na dose de 50 mg/kg (MET50) ou extrato de *Murraya paniculata* nas doses 100 mg/kg (MPE 100), 200 mg/kg (MPE 200) ou 400 mg/kg (MPE 400). (n=6). As médias dos grupos tratados D (Após tratamento) foram comparadas com o grupo A (antes do tratamento) e foram consideradas significativamente diferentes para (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Tabela 4. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis de triglicerídeos plasmáticos, em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	Triglicerídeos 1 Semana Média \pm EPM (mg/dL)	Triglicerídeos 15 dias Média \pm EPM (mg/dL)	Triglicerídeos 1 mês Média \pm EPM (mg/dL)	Triglicerídeos 2 meses Média \pm EPM (mg/dL)
MPE 100 A	501.7 \pm 57.31	501.7 \pm 57.31	501.7 \pm 57.31	501.7 \pm 57.31
MPE 100 D	149.0 \pm 20.10***	174.9 \pm 7.02***	122.4 \pm 6.48***	124.9 \pm 4.74***
MPE 200 A	311.8 \pm 68.96	311.8 \pm 68.96	311.8 \pm 68.96	311.8 \pm 68.96
MPE 200 D	117.8 \pm 8.82*	164.6 \pm 25.76	117.9 \pm 20.47*	144.3 \pm 16.28*
MPE 400 A	456.5 \pm 78.06	456.5 \pm 78.06	456.5 \pm 78.06	456.5 \pm 78.06
MPE 400 D	129.7 \pm 7.131**	136.8 \pm 15.59**	107.3 \pm 10.09**	136.0 \pm 12.98**
GLI 5 A	319.2 \pm 40.27	319.2 \pm 40.27	319.2 \pm 40.27	319.2 \pm 40.27
GLI 5 D	162.9 \pm 7.49**	115.8 \pm 15.96***	69.77 \pm 6.82***	136.0 \pm 12.98**
MET 50 A	488.3 \pm 43.48	488.3 \pm 43.48	488.3 \pm 43.48	488.3 \pm 43.48
MET 50 D	77.12 \pm 4.92***	113.4 \pm 20.44***	73.93 \pm 8.51***	119.9 \pm 7.16***
CD A	258.8 \pm 8.22	258.8 \pm 8.22	258.8 \pm 8.22	258.8 \pm 8.22
CD D	274.1 \pm 16.66	272.0 \pm 2.03	283.0 \pm 23.67	343.4 \pm 39.44

Os valores representam médias \pm EPM para os níveis de triglicerídeos (n=6). Número de animais especificados em parêntese. MPE 100=extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE 200=extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE 400=extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI 5=glibenclamida 5 mg/Kg; MET50=metformina 50 mg/Kg; CD=controle diabético. A=antes do tratamento e D=depois do tratamento.

5.7 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Colesterol Total

Na Figura 7, pode-se avaliar a variação dos níveis de colesterol plasmático ao longo dos dois meses de experimento. Em uma semana de tratamento, verificou-se que a dose de 100 mg/kg apresentou uma importante redução dos níveis séricos de colesterol 44,39% ($137,3 \pm 3,14$ para $76,34 \pm 6,86$), $***p < 0,001$ quando comparada com as demais doses e ao controle diabético. O grupo tratado com a metformina reduziu de forma mais significativa o valor de colesterol em 43,34% ($91,35 \pm 7,28$ para $51,73 \pm 4,04$), $***p < 0,001$. O controle diabético aumentou os seus níveis de colesterol, passando de ($129,3 \pm 6,36$ para $153,0 \pm 9,86$).

Conforme é mostrado na Tabela 5, em todos os grupos tratados com MPE registrou-se, de forma significativa, uma redução dos níveis séricos de colesterol ao longo de duas semanas de tratamento, $***p < 0,001$, MPE 100mg/Kg 48,84% ($137,3 \pm 3,14$ para $70,23 \pm 2,12$); MPE 200 mg/Kg 65,51% ($158,8 \pm 10,21$ para $54,77 \pm 5,38$); MPE 400 mg/Kg 56,68% ($142,5 \pm 12,72$ para $61,72 \pm 4,93$), de forma semelhante a redução observada para a metformina 49,65% ($91,35 \pm 7,28$ para $45,99 \pm 3,15$), $***p < 0,001$, o grupo tratado com glibenclamida reduziu significativamente os níveis séricos de colesterol na ordem de 29,95% ($100,9 \pm 7,72$ para $70,68 \pm 4,99$), $**p < 0,01$ (Tabela 5).

Ainda segundo os achados de Gautam et al. (2012a), foi possível verificar uma redução significativa nos níveis plasmáticos de colesterol após duas semanas de tratamento com o extrato MPE nas doses de (100, 200 e 400mg/Kg), bem como no grupo tratado com glibenclamida.

Ao analisar a variação dos níveis de colesterol em ratos diabéticos tratados com o extrato da planta *M. koenigii*, El-Amin e colaboradores (2013), verificaram que após treze dias de tratamento, os grupos tratados com metformina, e com o extrato nas concentrações de (100 e 200mg/Kg), foram capazes de diminuir significativamente as valores de colesterol.

A dosagem do colesterol plasmático de um mês de tratamento, apresentou diminuição significativa para os grupos tratados com MPE 100mg/Kg e 200 mg/Kg, $***p < 0,001$, em que os valores observados no primeiro grupo foram 39,35% ($137,3 \pm 3,14$ para $83,27 \pm 8,21$) e no segundo grupo 52,68% ($158,8 \pm 10,21$ para $75,14 \pm 7,38$). Nos grupos tratados com as drogas clássicas houve uma redução significativa, os níveis de colesterol plasmático encontrado foram: glibenclamida 43,02% ($109,0 \pm 7,72$ para $62,10 \pm 3,83$) $***p < 0,001$ e metformina 38,50% ($91,35 \pm 7,28$ para $56,18 \pm 3,74$), $**p < 0,01$.

Após 21 dias de tratamento com o extrato da planta *Murraya paniculata*, Gautam e colaboradores (2012b), observaram que os grupos tratados com MPE (200 e 400mg/Kg) assim como o grupo tratado com glibenclamida, causaram redução significativa nos níveis de colesterol plasmático em relação ao grupo controle.

Estudos realizado por Kesari *et al* (2007), constatou-se uma diminuição significativa nos níveis de colesterol plasmático, em animais diabéticos tratados com o extrato da planta *Murraya koenigii* na concentração de 300mg/Kg, ao longo de um mês de tratamento. Em um outro estudo com ratos diabéticos, realizado por Jayakumar & Ganesh (2012) com o extrato da mesma planta, estes autores observaram uma redução significativa nos grupos tratados com o extrato de *Murraya koenigii* (200mg/Kg), assim como o grupo tratado com glibenclamida ao longo de um mês de tratamento.

Ao longo de dois meses de tratamento, pode-se observar as seguintes reduções para os valores de colesterol plasmático, MPE 100mg/Kg 61,58%(137,3 ± 3,14 para 52,74 ± 1,48), ***p<0,001; MPE 200 mg/Kg 77,32%(158,8 ± 10,21 para 36,01 ± 4,66), ***p<0,001; MPE 400 mg/Kg 43,80%(142,5 ± 12,72 para 80,08 ± 21,89), *p<0,05. A análise dos grupos tratados com as drogas clássicas também apresentaram reduções significativas, glibenclamida 26,53%(109,0 ± 7,72 para 80,08 ± 21,89), ***p<0,001 e metformina 36,97%(91,35 ± 7,28 para 57,57 ± 3,24), **p<0,01. (Tabela 5). Esses achados de dois meses, não foram confrontados com a literatura por ser parte do primeiro estudo que avalia as ações do tratamento MPE a longo prazo.

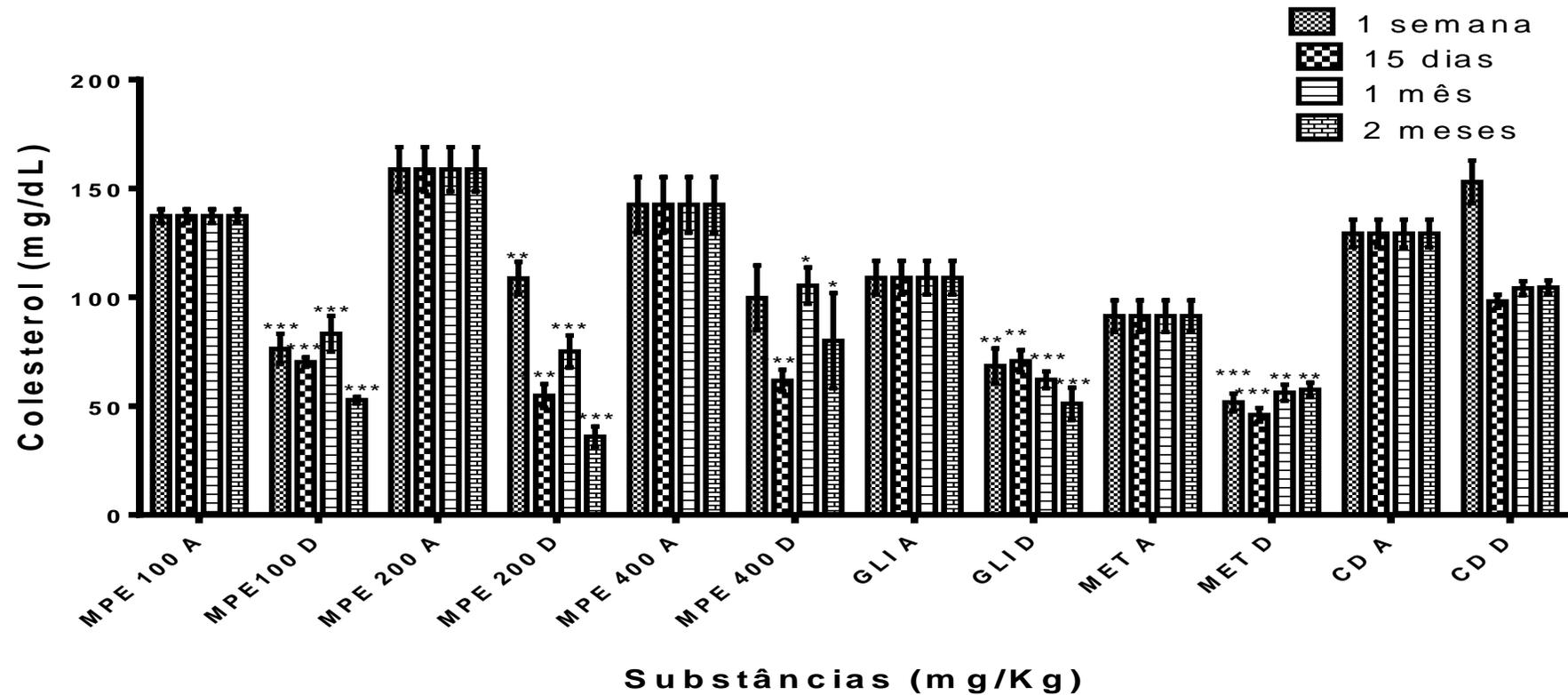


Figura 7. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de *M. paniculata* sobre os níveis de colesterol plasmático em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 5 mg/kg (GLI5), metformina na dose de 50 mg/kg (MET50) ou extrato de *M. paniculata* nas doses 100 mg/kg (MPE 100), 200 mg/kg (MPE 200) ou 400 mg/kg (MPE 400). (n=6). As médias dos grupos tratados D (Após tratamento) foram comparadas com o grupo A (antes do tratamento) e foram consideradas significativamente diferentes para (*p < 0,05 **p < 0,01; ***p < 0,001), ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Tabela 5. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis de colesterol plasmático, em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	Colesterol 1 Semana Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol 15 dias Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol 1 mês Média ± EPM (mg/dL)	Colesterol 2 meses Média ± EPM (mg/dL)
MPE 100 A	137.3 ± 3.14	137.3 ± 3.14	137.3 ± 3.14	137.3 ± 3.14
MPE 100 D	76.34 ± 6.86***	70.23 ± 2.12***	83.27 ± 8.21***	52.74 ± 1.48***
MPE 200 A	158.8 ± 10.21	158.8 ± 10.21	158.8 ± 10.21	158.8 ± 10.21
MPE 200 D	108.8 ± 7.49**	54.77 ± 5.38***	75.14 ± 7.38***	36.01 ± 4.66***
MPE 400 A	142.5 ± 12.72	142.5 ± 12.72	142.5 ± 12.72	142.5 ± 12.72
MPE 400 D	99.75 ± 14.85	61.72 ± 4.93***	105.4 ± 8.34*	80.08 ± 21.89*
GLI 5 A	109.0 ± 7.72	109.0 ± 7.72	109.0 ± 7.72	109.0 ± 7.72
GLI 5 D	68.46 ± 7.99**	70.68 ± 4.99**	62.10 ± 3.83***	80.08 ± 21.89***
MET 50 A	91.35 ± 7.28	91.35 ± 7.28	91.35 ± 7.28	91.35 ± 7.28
MET 50 D	51.73 ± 4.04***	45.99 ± 3.15***	56.18 ± 3.74**	57.57 ± 3.24**
CD A	129.3 ± 6.36	129.3 ± 6.36	129.3 ± 6.36	129.3 ± 6.36
CD D	153.0 ± 9.86	98.15 ± 2.98	104.2 ± 3.14	104.5 ± 3.21

Os valores representam médias±EPM para os níveis de colesterol plasmático (n=6). Número de animais especificados em parêntese. MPE 100=extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE 200=extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE 400=extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI 5=glibenclamida 5 mg/Kg; MET50=metformina 50 mg/Kg; CD=controle diabético. A=antes do tratamento e D=depois do tratamento.

5.8 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Transaminase hepática (AST – TGO)

Conforme constatou-se nos testes de toxicidade aguda para o extrato de *Murraya paniculata*, esta planta apresenta uma baixa toxicidade, apresentando uma DL₅₀ entre 2000 e 5000mg/Kg, diante disso pode-se constatar uma diminuição nos níveis séricos da transaminase hepática AST.

A análise da transaminase hepática (AST) após uma semana de tratamento, mostrou que, os grupos tratados com o MPE nas diferentes concentrações, apresentaram reduções nos valores enzimáticos, sendo que apenas o grupo tratado com MPE 100mg/Kg apresentou dados estatisticamente significativos, ***p<0,001, na ordem de 55,47% (42,67 ± 2,90 para 19,00 ± 0,68) nos níveis de AST, de forma semelhante ao grupo tratado com metformina, 41,70% (60,33 ± 3,24 para 35,17 ± 1,01) ***p<0,001. (Figura 8)/(Tabela 6).

Ao longo de duas semanas de tratamento, os valores de AST apresentaram redução igualmente significativa, ***p<0,001, nos grupos tratados com MPE 100mg/Kg 47,26% (42,67 ± 2,90 para 22,50 ± 0,50); MPE 400mg/Kg 39,67% (40,33 ± 2,09 para 24,33 ± 1,20) e no grupo tratado com metformina 61,87% (60,33 ± 3,24 para 23,00 ± 0,44).

Um estudo realizado por Pande *et al* (2009) mostrou uma importante atividade hepatoprotetora do extrato da casca da planta *Murraya koenigii* LINN frente a atividade hepatotóxica de tetracloreto de carbono, observou-se uma diminuição nos níveis séricos da transaminase hepática AST.

Com um mês de tratamento, os valores da transaminase hepática AST, apresentou redução nos seus níveis em todos os grupos tratados com MPE, MPE 100mg/Kg 47,66% (42,67 ± 2,90 para 22,33 ± 1,08), ***p<0,001; MPE 200mg/Kg 30,33% (29,67 ± 3,02 para 20,67 ± 0,98), *p<0,01 e MPE 400mg/Kg 52,88% (40,33 ± 2,09 para 19,00 ± 1,23), ***p<0,001. Observou-se redução também no grupo tratado com glibenclamida 29,46% (37,33 ± 1,33 para 26,33 ± 3,80), *p<0,05 e metformina 68,50% (60,33 ± 3,24 para 18,00 ± 1,03), ***p<0,001, conforme percebe-se na Tabela 6.

Kesari e colaboradores (2007), reportam em seus achados, a baixa toxicidade do extrato da planta *M. koenigii*, após um mês de tratamento em ratos diabéticos, em que se verificou uma diminuição nos níveis séricos da transaminase hepática AST.

Ao término de dois meses de tratamento, os níveis séricos de AST foram reduzidos em todos os grupos tratados, sendo significativo nos grupos tratados com MPE 100mg/Kg 51,76% (42,67 ± 2,90 para 20,58 ± 2,20), ***p<0,001; MPE 200 mg/Kg 26,96% (29,67 ± 3,02 para 21,67 ± 0,80), *p<0,05 e MPE 400mg/Kg 51,22% (40,33 ± 2,09 para 19,67 ± 1,08),

*** $p < 0,001$. Os grupos tratados com as drogas clássicas também apresentaram reduções significativas; glibenclamida 40,18% ($37,33 \pm 1,33$ para $22,33 \pm 2,09$), *** $p < 0,001$ e metformina 65,73% ($60,33 \pm 3,24$ para $20,67 \pm 1,22$), ** $p < 0,01$. Os achados de um e dois meses de tratamento, não foram confrontados com a literatura, por fazer parte do primeiro estudo que avalia as ações do extrato da planta *M. paniculata* a longo prazo.

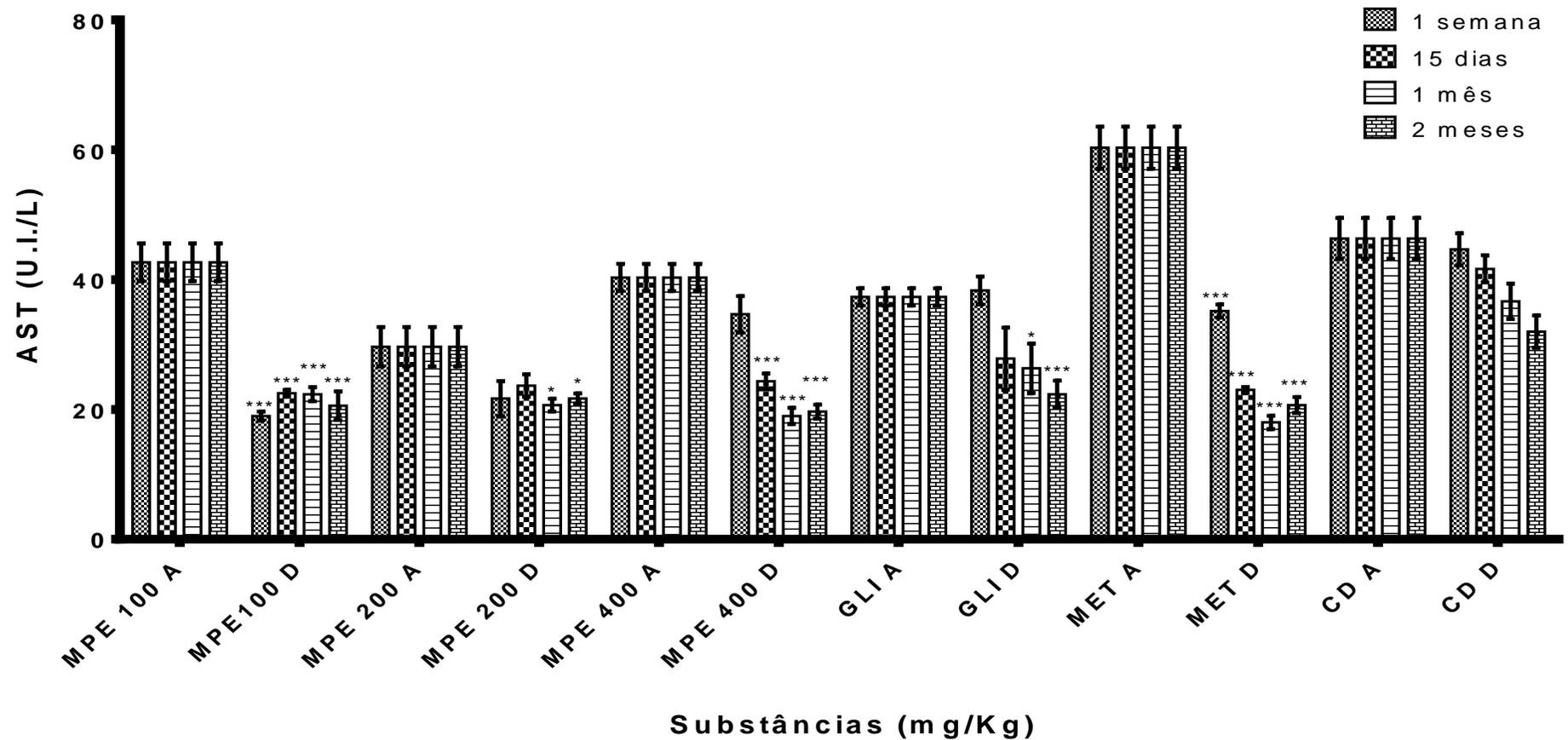


Figura 8. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de *M. paniculata* sobre os níveis da transaminase hepática AST em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 5mg/kg (GLI5), metformina na dose de 50 mg/kg (MET50) ou extrato de *M. paniculata* nas doses 100 mg/kg (MPE 100), 200 mg/kg (MPE 200) ou 400 mg/kg (MPE 400). (n=6). As médias dos grupos tratados D (Após tratamento) foram comparadas com o grupo A (antes do tratamento) e foram consideradas significativamente diferentes para (*p < 0,05 **p < 0,01; ***p < 0,001), ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Tabela 6. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis séricos de AST em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	AST 1 Semana Média ± EPM (U.I./L)	AST 15 dias Média ± EPM (U.I./L)	AST 1 mês Média ± EPM (U.I./L)	AST 2 meses Média ± EPM (U.I./L)
MPE 100 A	42.67 ± 2.90	42.67 ± 2.90	42.67 ± 2.90	42.67 ± 2.90
MPE 100 D	19.00 ± 0.68***	22.50 ± 0.50***	22.33 ± 1.08***	20.58 ± 2.20***
MPE 200 A	29.67 ± 3.02	29.67 ± 3.02	29.67 ± 3.02	29.67 ± 3.02
MPE 200 D	21.67 ± 2.70	23.67 ± 1.74	20.67 ± 0.98*	21.67 ± 0.80*
MPE 400 A	40.33 ± 2.09	40.33 ± 2.09	40.33 ± 2.09	40.33 ± 2.09
MPE 400 D	34.00 ± 3.34	24.33 ± 1.20***	19.00 ± 1.23***	19.67 ± 1.08***
GLI 5 A	37.33 ± 1.33	37.33 ± 1.33	37.33 ± 1.33	37.33 ± 1.33
GLI 5 D	38.33 ± 2.15	27.83 ± 4.77	26.33 ± 3.80*	22.33 ± 2.09***
MET 50 A	60.33 ± 3.24	60.33 ± 3.24	60.33 ± 3.24	60.33 ± 3.24
MET 50 D	35.17 ± 1.01***	23.00 ± 0.44***	18.00 ± 1.03***	20.67 ± 1.22***
CD A	46.33 ± 3.15	46.33 ± 3.15	46.33 ± 3.15	46.33 ± 3.15
CD D	44.67 ± 2.45	41.67 ± 2.09	36.67 ± 2.71	32.00 ± 2.47

Os valores representam médias±EPM para os níveis séricos de AST (n=6). Número de animais especificados em parêntese. MPE 100=extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE 200=extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE 400=extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI 5=glibenclamida 5 mg/Kg; MET50=metformina 50 mg/Kg; CD=controle diabético. A=antes do tratamento e D=depois do tratamento.

5.9 Avaliação dos parâmetros bioquímicos – Transaminase hepática (ALT – TGP)

Após uma semana de tratamento, a análise da transaminase hepática ALT, mostrou que em todos os grupos tratados com MPE apresentaram redução nos seus valores enzimáticos, MPE 100 mg/Kg 42,64% ($50,42 \pm 3,78$ para $28,92 \pm 5,09$), $**p < 0,01$; MPE 200mg/Kg 41,87% ($43,58 \pm 4,05$ para $25,33 \pm 2,71$), $**p < 0,01$ e MPE 400mg/Kg 37,64% ($29,67 \pm 2,10$ para $18,50 \pm 1,45$), $**p < 0,01$, também de forma semelhante a metformina 21,93% ($38,75 \pm 1,05$ para $30,25 \pm 1,25$), $***p < 0,001$. (Figura 9)/(Tabela 7).

Passados quinze dias de tratamento, os níveis séricos da enzima ALT, apresentaram redução em todos os grupos analisados, sendo estatisticamente significante o grupo tratado com MPE 100mg/Kg, em que os valores reduziram na ordem de 43,31% ($50,42 \pm 3,78$ para $28,58 \pm 0,58$), $***p < 0,001$. Em um estudo realizado por Pande *et al* (2009) com outra planta do gênero *Murraya*, mostrou uma importante atividade hepatoprotetora do extrato da casca da planta *Murraya koenigii* LINN frente a atividade hepatotóxica de tetracloreto de carbono.

Os resultados encontrados para os níveis séricos da enzima ALT após um mês de tratamento, mostraram que apenas a dose de MPE 200mg/Kg reduziu significativamente os níveis séricos dessa enzima, na ordem de 37,08% ($43,58 \pm 4,05$ para $27,42 \pm 3,39$), $*p < 0,05$.

Ao analisar-se os níveis séricos da enzima ALT após dois meses de tratamento, observou-se que nos grupos tratados com o extrato MPE houve uma diminuição significativa no grupo MPE 100 mg/Kg 43,47% ($50,42 \pm 3,78$ para $28,50 \pm 6,31$), $*p < 0,05$. O grupo tratado com metformina também apresentou redução significativa na ordem de 25,6% ($38,75 \pm 1,05$ para $28,83 \pm 2,68$), $**p < 0,01$.

Estudos realizados por Kesari *et al.* (2007), mostraram-se que o extrato da planta *Murraya koenigiin*, após um mês de tratamento a ratos diabéticos é responsável por causar uma diminuição significativa nos níveis séricos da transaminase hepática ALT.

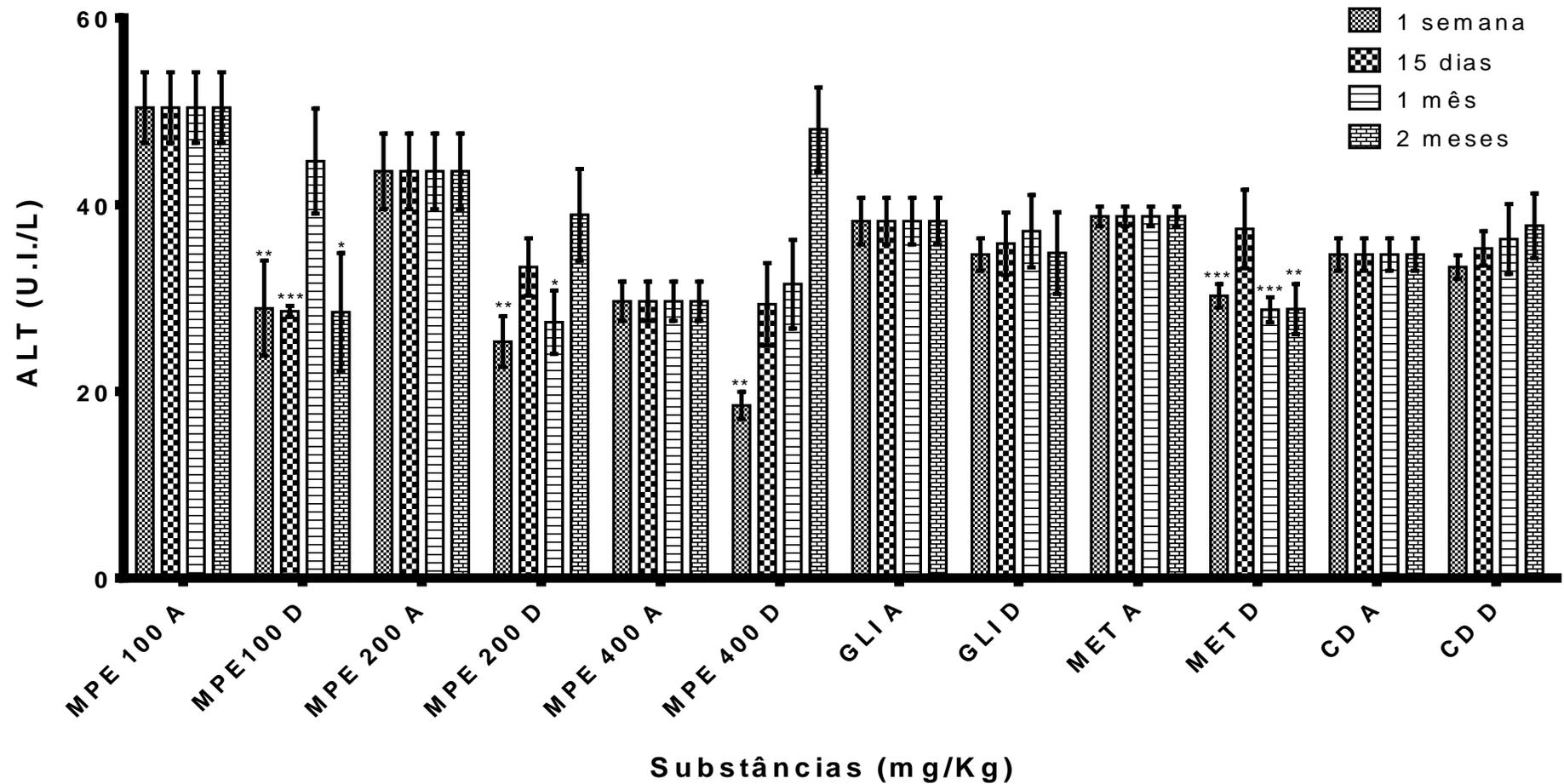


Figura 9. Curva tempo-resposta do efeito do tratamento por via oral do extrato de *Murraya paniculata* sobre os níveis da transaminase hepática ALT em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 5mg/kg (GLI5), metformina na dose de 50 mg/kg (MET50) ou extrato de *M. paniculata* nas doses 100 mg/kg (MPE 100), 200 mg/kg (MPE 200) ou 400 mg/kg (MPE 400). (n=6). As médias dos grupos tratados D (Após tratamento) foram comparadas com o grupo A (antes do tratamento) e foram consideradas significativamente diferentes para (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Tabela 7. Efeito do tratamento com MPE sobre os níveis séricos de ALT em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	ALT 1 Semana Média ± EPM (U.I./L)	ALT 15 dias Média ± EPM (U.I./L)	ALT 1 mês Média ± EPM (U.I./L)	ALT 2 meses Média ± EPM (U.I./L)
MPE 100 A	50.42 ± 3.78	50.42 ± 3.78	50.42 ± 3.78	50.42 ± 3.78
MPE 100 D	28.92 ± 5.09**	28.58 ± 0.58***	44.67 ± 5.63	28.50 ± 6.31*
MPE 200 A	43.58 ± 4.05	43.58 ± 4.05	43.58 ± 4.05	43.58 ± 4.05
MPE 200 D	25.33 ± 2.71**	33.33 ± 3.07	27.42 ± 3.39*	38.92 ± 4.92
MPE 400 A	29.67 ± 2.10	29.67 ± 2.10	29.67 ± 2.10	41.92 ± 4.16
MPE 400 D	18.50 ± 1.45**	29.33 ± 4.40	31.50 ± 4.75	48.08 ± 4.48
GLI 5 A	38.25 ± 2.50	38.25 ± 2.50	38.25 ± 2.50	38.25 ± 2.50
GLI 5 D	34.67 ± 1.72	35.83 ± 3.34	37.17 ± 3.87	34.83 ± 4.37
MET 50 A	38.75 ± 1.05	38.75 ± 1.05	38.75 ± 1.05	38.75 ± 1.05
MET 50 D	30.25 ± 1.25***	37.42 ± 4.19	28.75 ± 1.35***	28.83 ± 2.68**
CD A	34.67 ± 1.73	34.67 ± 1.73	34.67 ± 1.73	34.67 ± 1.73
CD D	33.33 ± 1.26	35.33 ± 1.83	36.33 ± 3.73	37.75 ± 3.46

Os valores representam médias±EPM para os níveis séricos de ALT (n=6). Número de animais especificados em parêntese. MPE 100=extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE 200=extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE 400=extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI 5=glibenclamida 5 mg/Kg; MET50=metformina 50 mg/Kg; CD=controle diabético. A=antes do tratamento e D=depois do tratamento.

5.10 Atividade hipoglicemiante do extrato de *M. paniculata* e das drogas clássicas (glibenclamida e metformina) através de dois métodos de rastreamento da glicação: Frutosamina e Hemoglobina glicada.

A Figura 10 mostra os resultados da dosagem de frutosamina após um mês de tratamento. Esses resultados, analisados por ANOVA seguidos do teste de Tukey, mostraram que os ratos tratados com MPE em todas as doses estudadas mostraram níveis séricos de frutosamina semelhantes aos ratos normais não tratados e aos tratados com as drogas hipoglicemiantes clássicas glibenclamida e metformina. Os ratos tratados com MPE 100mg/Kg apresentaram valor médio sérico de frutosamina ($\mu\text{mol/L}^2$) de $225,50 \pm 9,90 \mu\text{mol/L}^3$, $**p < 0,01$; os ratos tratados com MPE 200mg/Kg de $198,70 \pm 15,11$, $***p < 0,001$ e os ratos tratados com MPE 400mg/Kg de $173,50 \pm 32,48 \mu\text{mol/L}^3$, sendo estes estatisticamente significativos em relação ao controle diabético ($420,13 \pm 34,78 \mu\text{mol/L}^3$). O grupo tratado com glibenclamida apresentou níveis séricos na ordem de ($229,50 \pm 22,35 \mu\text{mol/L}^3$), $**p < 0,01$, o grupo tratado com metformina ($172,90 \pm 18,40 \mu\text{mol/L}^3$), $***p < 0,001$. Os animais normais não tratados, apresentaram um valor de frutosamina de ($163,0 \pm 12,49 \mu\text{mol/L}^3$). (Tabela 8).

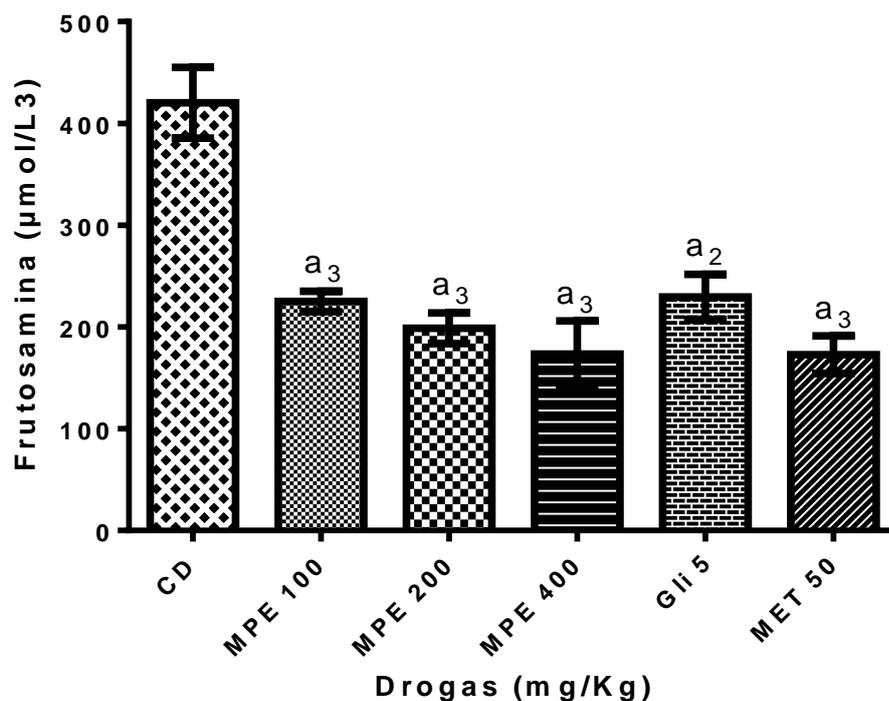


Figura 10. Avaliação da Frutosamina após um mês de tratamento de ratos diabéticos com MPE, glibenclamida e metformina. MPE100 vs CD (a₃ p<0,001); MPE200 vs CD (a₃ p<0,001); MPE400 vs CD (a₃ p<0,001; GLI5 vs CD (a₂ p<0,01); MET50 vs CD (a₃ p<0,001), após Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey.

Tabela 8. Efeito do tratamento de médio prazo (um mês) com MPE sobre as concentrações de Frutosamina em ratos diabéticos induzidos por aloxano.

Grupos (mg/Kg, vo)	Frutosamina ($\mu\text{mol/L}^2$) % \pm EPM
CD	420,13 \pm 34,78
MPE100	225,5 \pm 9,90 ^a
MPE200	198,70 \pm 15,11 ^a
MPE400	173,50 \pm 32,48 ^a
GLI5	229,50 \pm 22,35 ^a
MET50	172,90 \pm 18,49 ^a

Os valores representam médias \pm EPM dos níveis de frutosamina. N=6. CD=controle diabético; MPE100=Extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE200= Extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE400=Extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI5=glibenclamida 5 mg/Kg e MET50=Metformina 50 mg/Kg. Valor da Frutosamina do controle normal não tratado (163.0 \pm 12.49).

O controle glicêmico é extremamente importante, pois um estado de constante hiperglicemia acarreta diversas complicações, promovendo o desenvolvimento de lesões orgânicas extensas e irreversíveis, afetando os olhos, os rins, os nervos, os vasos grandes e pequenos, assim como a coagulação sanguínea. Em seres humanos, a hemoglobina glicada e a frutosamina são ferramentas importantes para monitorar o tratamento do diabetes mellitus, pois fornecem informações precisas dos níveis glicêmicos médios a curto e longo prazo (MARCA *et al.*, 2000).

A Figura 10 mostra os resultados de todos os grupos em estudo para os níveis séricos de hemoglobina glicada. Os resultados, analisados por ANOVA seguidos do teste de Tukey, mostraram que após os dois meses de tratamento todos os grupos tratados com MPE em todas as doses estudadas mostraram níveis séricos de hemoglobina glicada semelhantes aos ratos tratados com as drogas hipoglicemiantes clássicas glibenclamida e metformina. O extrato MPE na dose de 100 mg/kg reduziu a dosagem da hemoglobina glicada (HBA1c) para o valor médio (%) de $6,35 \pm 0,40$; MPE 200 mg/Kg apresentou um valor de hemoglobina glicada (HBA1c) em % de $5,37 \pm 0,30$ e MPE 400 mg/Kg um valor de hemoglobina glicada (HBA1c) em % $5,71 \pm 0,44$. O grupo tratado com glibenclamida valor de hemoglobina glicada (HBA1c) em % de $6,04 \pm 0,68$ e o grupo tratado com metformina um valor de hemoglobina glicada (HBA1c) em % $6,08 \pm 0,55$. O controle diabético mostrou níveis de hemoglobina glicada (HBA1c) em % de $12,15 \pm 0,60$. O controle normal não tratado apresentou um valor de hemoglobina glicada (HBA1c) em % de $2,13 \pm 0,68$. (Tabela 8).

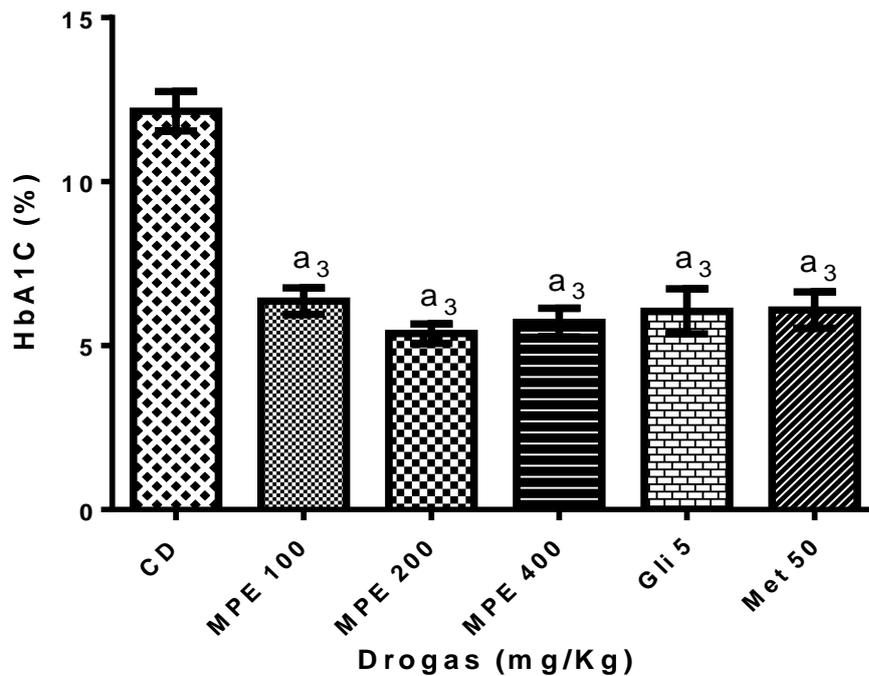


Figura 11. Avaliação da HbA1C após dois meses de tratamento de ratos diabéticos com MPE, glibenclamida e metformina. ^a₃ p<0,001 (MPE100 vs CD; MPE200 vs CD; MPE400 vs CD; GLI5 vs CD; MET50 vs CD) após Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey

Tabela 9. Efeito do tratamento prolongado (dois meses) com extrato de *Murraya paniculata* e drogas clássicas sobre as concentrações de Hemoglobina Glicada (HbA1C) em ratos diabéticos induzido por aloxano.

Grupos (mg/Kg, vo)	HbA1C %± EPM
CD	12,15 ± 0,60
MPE100	6,35 ± 0,40 ^a
MPE200	5,37 ± 0,30 ^a
MPE400	5,71 ± 0,44 ^a
GLI5	6,04 ± 0,68 ^a
MET50	6,08 ± 0,55 ^a

Os valores representam médias±EPM dos níveis de hemoglobina glicada. N=6. CD=controle diabético; MPE100=Extrato de *M. paniculata* 100 mg/Kg; MPE200= Extrato de *M. paniculata* 200 mg/Kg; MPE400=Extrato de *M. paniculata* 400 mg/Kg; GLI5=glibenclamida 5 mg/Kg e MET50=Metformina 50 mg/Kg. Valor da hemoglobina glicada do controle normal não tratado (2,13 ± 0,68).

Esses achados de hemoglobina glicada para o controle diabético, o grupo tratado com glibenclamida e o MPE 100, são compatíveis com os resultados encontrados por Subramanian

& Arulselvan, (2007), ao analisar a hemoglobina glicada em ratos tratados com o extrato das folhas de *Murraya koenigii*.

Segundo Nathan *et al.*, (2008), o processo de glicação de proteínas não se restringe apenas a ligação da glicose com a hemoglobina, formando a hemoglobina glicada. Ao contrário, esse processo estende-se, praticamente, a muitas proteínas do organismo, contribuindo para a geração dos chamados produtos finais da glicação avançada (“Advanced Glycation end products” = AGEs).

Os resultados de HbA1C e frutossamina obtidos para os ratos tratados com MPE indicam que esta planta pode inibir o desenvolvimento de lesões micro e macrovasculares advindas do DM, confirmando os achados recentes de Zou *et al* (2014) que mostraram um efeito protetor de flavonóides totais extraídos das folhas de *M. paniculata* na nefropatia diabética em ratos, onde parâmetros como albumina, creatinina, ureia e interleucina-6 foram significativamente diminuídos pelo tratamento. Outro aspecto importante atribuído a *M. paniculata* é sua possível eficácia sobre outras patologias de base inflamatória, uma vez que segundo Narkhede *et al* (2012) o extrato das folhas de *M. Paniculata* exibiu significativa ação anti-inflamatória e atividade analgésica em modelos inflamatórios agudos e crônicos.

Estudos com cumarinas isoladas de *M. paniculata* evidenciaram sua atividade hipoglicemiante e efeito inibitório sobre a atividade da enzima aldose redutase e sobre a agregação plaquetária, as quais são consideradas como as causas das complicações diabéticas (FORT *et al.*, 2000a).

5.11 Estudo de associação das drogas – Uma semana de tratamento

Tendo como objetivo identificar um possível mecanismo de ação hipoglicemiante do extrato de *M. paniculata*, foram definidas doses que apresentavam um efeito terapêutico baixo para o extrato MPE, glibenclamida e metformina (10, 2 e 5 mg/Kg respectivamente) em que estas doses foram utilizadas em associação

A Figura 12 expressa os valores da glicose plasmática dos animais após uma semana de tratamento em associação do extrato de *M. paniculata* com as drogas clássicas (glibenclamida e metformina), observou-se que os grupos tratados em associação com o extrato MPE e as drogas clássicas apresentaram uma potencialização do efeito hipoglicemiante significativa ao longo de uma semana de tratamento, os grupos tratados com a associação do extrato MPE 10mg/Kg e glibenclamida 2mg/Kg, apresentou uma redução nos níveis glicêmicos na ordem de 19,75% (383.2 ± 18.04 para 307.5 ± 16.59), * $p < 0,05$, assim como o grupo tratado com a

associação do extrato MPE 10mg/Kg com a metformina 5mg/Kg apresentou uma redução dos níveis glicêmicos na ordem de 22,68% (390.2 ± 22.01 para $301.7 \pm 23,37$), $*p < 0,05$. Tabela 9. Esses resultados indicam que possivelmente haja um sinergismo com relação ao efeito hipoglicemiante do MPE com as drogas clássicas glibenclamida e metformina, em que o extrato pode exercer parte do seu efeito hipoglicemiante via bloqueio de canais de potássio como também aumentando a captação da glicose periférica, melhorando a ligação da insulina aos seus receptores.

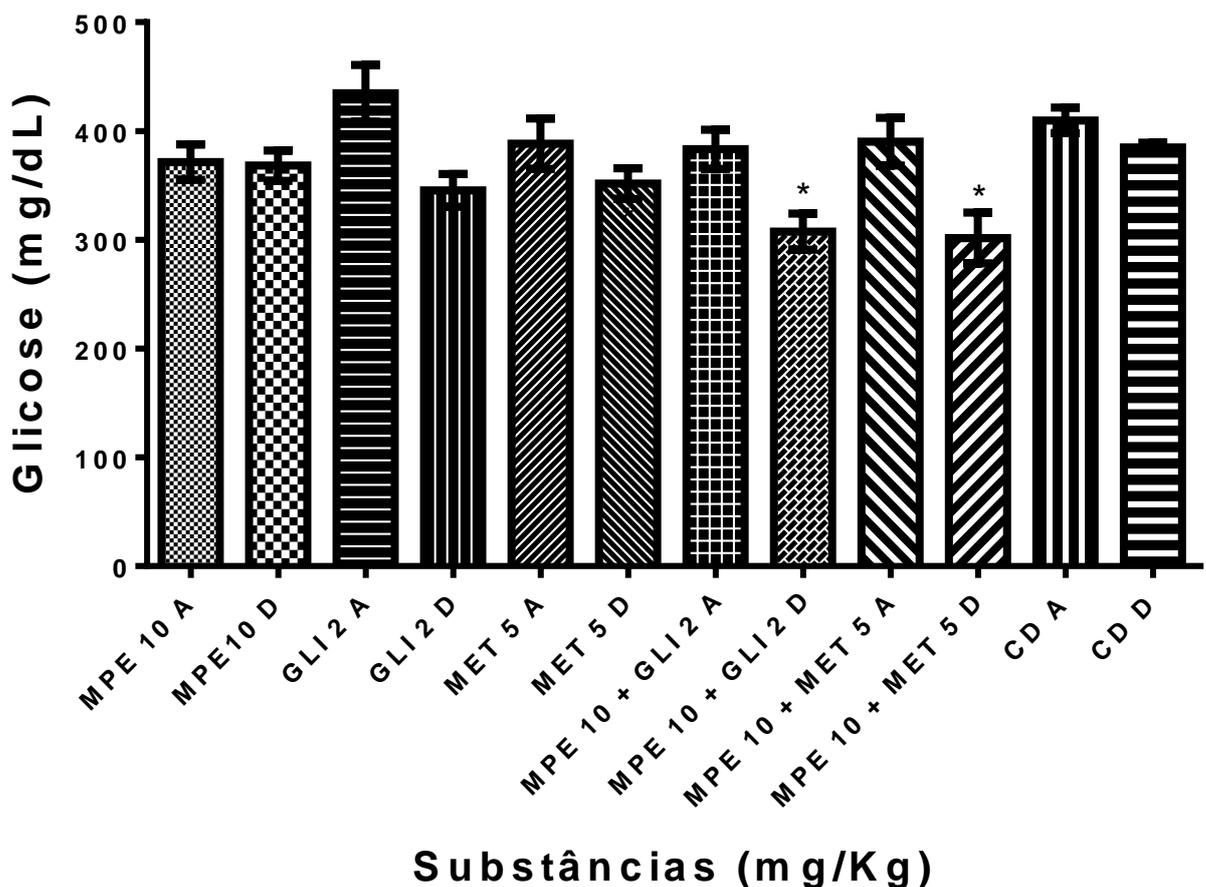


Figura 12. Estudo de potencialização do efeito hipoglicemiante curva tempo-resposta do tratamento por via oral do extrato de *M. paniculata* sobre a glicemia plasmática em ratos Wistar. Os animais foram tratados com veículo água (CD), glibenclamida na dose de 2mg/kg (GLI2), metformina na dose de 5 mg/kg (MET5), extrato de *M. paniculata* na dose 10 mg/kg (MPE 10), extrato de *M. paniculata* na dose 10mg/Kg + glibenclamida 2mg/Kg (MPE10 + GLI2) e extrato de *M. paniculata* na dose 10mg/Kg + metformina 5mg/Kg (MPE10 + MET5). (n=6). As médias dos grupos tratados D (Após tratamento) foram comparadas com o grupo A (antes do tratamento) e foram consideradas significativamente diferentes para ($*p < 0,05$ $**p < 0,01$; $***p < 0,001$), ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Tabela 10. Efeito do tratamento com extrato MPE (estudo de potencialização – Uma semana) sobre os níveis de glicose plasmática em ratos com diabetes induzido por aloxano. Significativo após teste de Tukey (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia 1 Semana Média ± EPM (mg/dL)
MPE 10 A	371.3 ± 16.21
MPE 10 D	368.2 ± 13.85
GLI 2 A	434.7 ± 25.99
GLI 2 D	345.5 ± 15.04
MET 5 A	388.2 ± 23.18
MET 5 D	351.7 ± 14.22
MPE 10 + GLI 2 A	383.2 ± 18.04
MPE 10 + GLI 2 D	307.5 ± 16.59*
MPE 10 + MET 5 A	390.2 ± 22.01
MPE 10 + MET 5 D	301.7 ± 23.37*
CD A	409.7 ± 11.72
CD D	385 ± 4.305

Os valores representam médias±EPM para os níveis séricos de glicose plasmática (n=6). Número de animais especificados em parêntese. MPE 10=extrato de *M. paniculata* 10 mg/Kg; GLI 2=glibenclamida 2 mg/Kg; MET 5=metformina 5 mg/Kg; MET 10 + GLI 2= extrato de *Murraya paniculata* 10 mg/Kg + glibenclamida 2 mg/Kg; MPE 10 + MET 5= extrato de *M. paniculata* 10 mg/Kg + metformina 5 mg/Kg; CD=controle diabético. A=antes do tratamento e D=depois do tratamento.

Os compostos presentes nas plantas podem exercer o seu efeito hipoglicemiante por diversos mecanismos de ação, contribuem para esse processo os seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células β -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica causada em lipídeos e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (Negri, 2005).

Flavonóides metilados também foram encontrados nas folhas de *M. paniculata* (Wu *et al.*, 1988). Miricetina é conhecido por estimular o mecanismo de corrente de Ca^{+2} para dentro das células beta pancreáticas, o que pode caracterizar que o extrato de *Murraya paniculata* pode

através do influxo aumentado de cálcio aumentar a secreção de insulina a partir das ilhotas de células de Langerhans e, finalmente, diminuir o nível de glicose no sangue (Wu *et al.*, 1988).

Gautam e colaboradores (2012b) ao avaliar o potencial hipoglicemiante e antioxidante do extrato de *M. paniculata*, reportaram que um possível mecanismo para o efeito hipogliceminante desse extrato era através do aumento da secreção pancreática de insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans.

Yadav e colaboradores (2002), em estudos realizados com a planta *M. koeingii* para verificar a atividade hipoglicemiante em ratos, tentando explicar o mecanismo de ação desta planta, propuseram como mecanismo mais provável a liberação de insulina pelas células Beta-pancreáticas, uma vez que o extrato desta planta não é muito efetivo no tratamento de casos graves de diabetes com níveis altos de glicose plasmática.

5.12 Determinação do mecanismo de ação do extrato de *Murraya paniculata* via bloqueio de canais de K⁺ na hiperglicemia induzida por diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos.

A glibenclamida estimula a secreção de insulina através do bloqueio dos canais de K⁺ - ATP dependentes nas membranas das células β -pancreáticas, causando uma despolarização e um influxo de Ca²⁺, enquanto que o diazóxido inibe a secreção de insulina prolongando o tempo de abertura dos canais de K⁺-ATP dependentes. O diazóxido também apresenta uma capacidade modesta de inibir a utilização periférica da glicose pelo músculo e estimular a gliconeogênese hepática (Davis, 2006). Neste estudo avaliou-se a capacidade do extrato MPE em prevenir a hiperglicemia induzida pelo diazóxido em ratos não diabéticos (Figura 13).

Os resultados analisados por ANOVA seguidos do teste de Tukey, mostraram que a hiperglicemia provocada pelo diazóxido em ratos normais foi significativamente revertida pelo extrato MPE 100mg/Kg em todos os tempos em que se avaliou os níveis glicêmicos, apresentando os seguintes valores em mg/dL: (130,5 \pm 2,25 uma hora; 119,2 \pm 7,15 duas horas e 121,80 \pm 2,67 três horas, quando comparado ao grupo tratado com a glibenclamida este apresentou um padrão normoglicêmico em todos os tempos analisados (uma hora: 73,94 \pm 2,75; duas horas: 63,64 \pm 3,31 e três horas: 80,61 \pm 4,58) (Tabela 10).

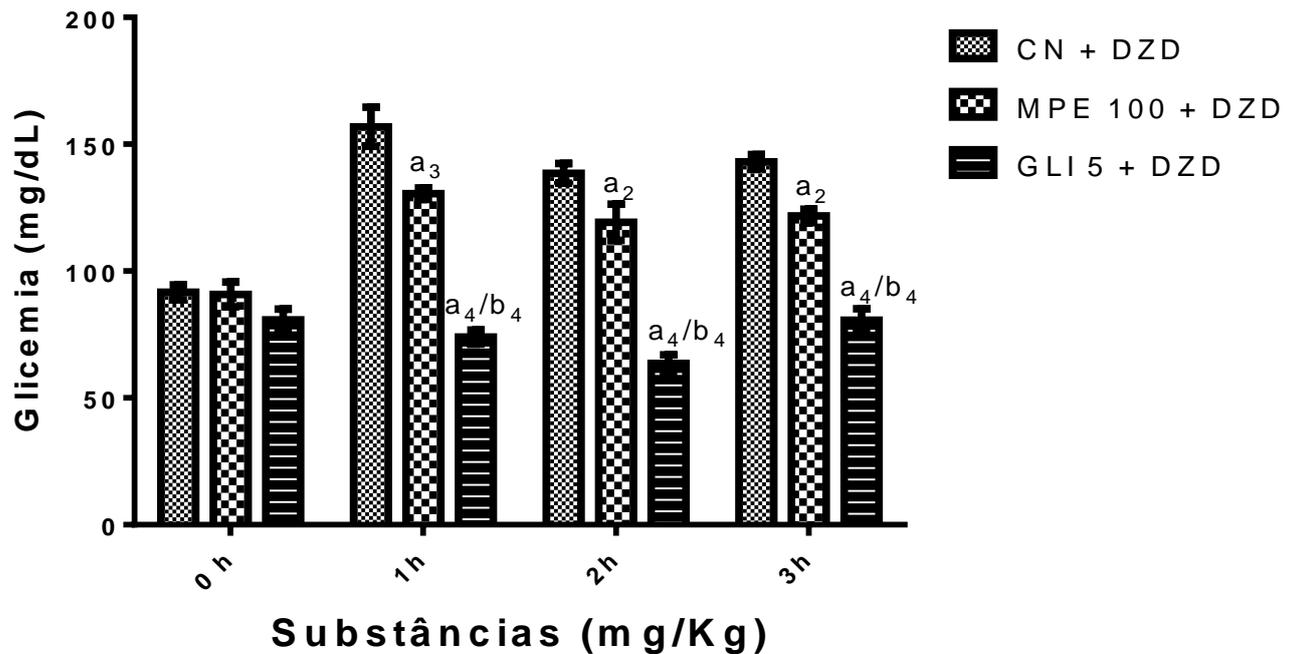


Figura 13. Avaliação do extrato MPE e da glibenclamida na curva glicêmica com diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos. (n=6). (a₂ p<0,01, a₃ p<0,001, a₄ p<0,0001 para 1h, 2h e 3h ((GLI 5 + DZD)^c vs (CN + DZD)^a; ((GLI 5 + DZD)^c vs (MPE 100 + DZD)^b). (a) Após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey.

Tabela 11. Avaliação do extrato de *M. paniculata* (MPE) e glibenclamida na curva glicêmica com diazóxido (DZD) em ratos não diabéticos. A glicemia foi avaliada no tempo zero (T0) após jejum de 12 horas. Logo em seguida os animais foram pré-tratados por via oral com MPE 100mg/Kg, GLI 5mg/Kg e água. Uma hora após foram tratados com DZD 125mg/Kg.

Grupos (mg/Kg, vo)	Glicemia (mg/dL)			
	0 hora	1 hora	2 horas	3 horas
CN + DZD	91.64 ± 2.932	156.9 ± 7.7	138.6 ± 3.89	143.1 ± 2.80
MPE 100 + DZD	90.83 ± 4.895	130.5 ± 2.25	119.2 ± 7.15	121.8 ± 2.67
GLI 5 + DZD	80.81 ± 4.185	73.94 ± 2.75	63.64 ± 3.31	80.61 ± 4.58

Os valores representam a média ± EPM dos níveis glicêmicos. (n=6). O número de animais encontra-se especificado em parêntese. CN+DZD=controle normal + diazóxido; MPE100+DZD=extrato de *M. paniculata* 100mg/Kg + diazóxido; GLI5+DZD= glibenclamida 5mg/mL + diazóxido.

5.13 Análise Histopatológica

Para a análise histopatológica foram selecionados apenas os órgãos fígado, rins e pâncreas, tendo em vista que, estes são os que apresentam maior comprometimento (GUELHO, D; PAIVA, I., & CARVALHEIRO, M, 2013). Ao longo de dois meses de tratamento, foram observados os seguintes aspectos nos grupos em estudo. No grupo controle, quando foi realizada a análise do fígado, foi observado que os hepatócitos apresentavam-se preservados e morfológicamente normais, além disso, o espaço portal e seus componentes (ramo da artéria hepática, ducto biliar e ramo da veia porta) apresentavam-se sem variações da normalidade e com ausência de inflamação e de hiperemia dos vasos sanguíneos. No pâncreas, vários lóbulos pancreáticos foram identificados. Os ácinos pancreáticos (serosos) e as ilhotas de Langerhans (Ilhotas pancreáticas) apresentavam-se com morfologia normal e ausência de infiltrado inflamatório. No rim foi possível observar a zona cortical e medular do órgão. Os glomérulos renais apresentavam-se numerosos, com o espaço de Bowman presente e folhetos viscerais e parietais bem definidos demonstrando aspecto de normalidade do órgão (Figura 14).

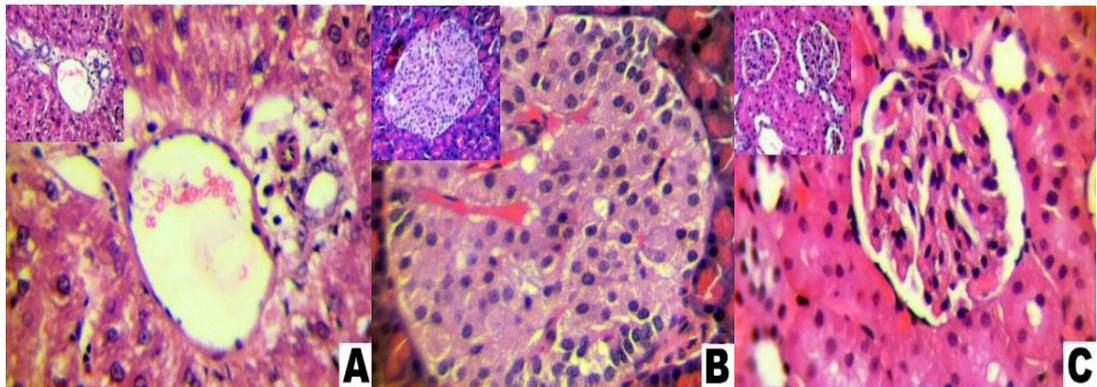


Figura 14. Avaliação histopatológica do controle normal (CN): (A) – Fígado, (B) – Pâncreas, (C) – Rim. (HE 100x)

Resultados esses compatíveis com os achados do estudo de Melazzo e colaboradores (2004) em que o pâncreas dos animais pertencentes ao grupo controle normal, apresentaram um arranjo clássico das células nas ilhotas pancreáticas, em que as células β (células positivas) ocupavam uma posição central e as outras células endócrinas (células negativas) encontravam-se em uma posição mais periférica.

No grupo controle diabético, quando foi realizada a análise do fígado, observou-se que os tecidos hepáticos conservavam a anatomia normal do órgão, contudo, algumas áreas de esteatose (degeneração lipídica) foram identificadas. Os espaços porta e seus constituintes

apresentavam-se bem definidos, no entanto, notou-se dilatação e hiperemia da veia centrolobular em algumas regiões. No pâncreas foram observados ácinos pancreáticos sem alterações morfológicas evidentes e redução do volume das ilhotas de Langerhans, bem como irregularidades na forma desta estrutura e áreas sugestivas de fragmentação nuclear. No tecido renal foi possível observar a presença de numerosos glomérulos renais, sendo que alguns destes apresentavam redução de volume glomerular e aumento do espaço de Bowman, além da presença de substância amorfa no interior do glomérulo (área sugestiva de hialinização glomerular parcial e/ou total), redução parcial ou total dos tufo capilares (sugerindo atrofia da estrutura) e poucas áreas com a presença de células inflamatórias mononucleares (Figura 15).

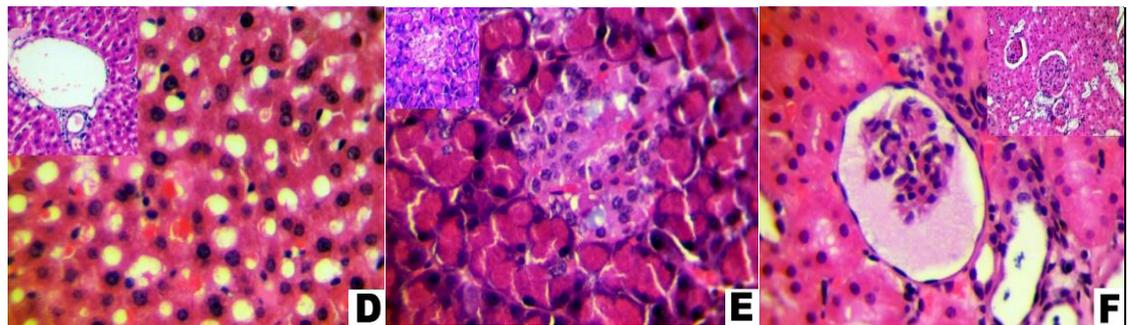


Figura 15. Avaliação histopatológica do controle diabético (CD): (D) – Fígado, (E) – Pâncreas, (F) – Rim. (HE 100x)

As principais alterações observadas no pâncreas de animais diabéticos são caracterizadas por uma diminuição das células β , e uma citoarquitetura das ilhotas, além de apresentar uma distribuição irregular de outras células pancreáticas (GEPTS & LECOMPTE, 1981). Um outro tipo de lesão que pode ser encontrado no pâncreas de animais diabéticos, é a infiltração linfocítica nas ilhotas, também denominada de insulite, uma vez que os linfócitos são atraídos pela presença de antígenos nas células β e essa pode ser a causa da destruição progressiva da célula (KESSLER *et al*, 1999).

Para o grupo tratado com glibenclamida foi observado que a morfologia dos hepatócitos, em sua grande maioria, se encontravam em aspecto de normalidade, assim como espaço porta. A veia centrolobular apresentava-se discretamente hiperemiada e escassas áreas em degeneração lipídica também foram identificadas. No tecido pancreático foi possível observar que os ácinos pancreáticos se apresentavam sem alterações morfológicas dignas de nota. As ilhotas de Langerhans apresentavam-se com formato regular e volume reduzido além de em menor número quando comparadas ao órgão controle. Quanto ao sistema renal foi percebido a presença de numerosos glomérulos renais, que em sua grande maioria, eram semelhantes aos

glomérulos normais, com exceção de alguns poucos com discreta redução de volume glomerular. (Figura 16).

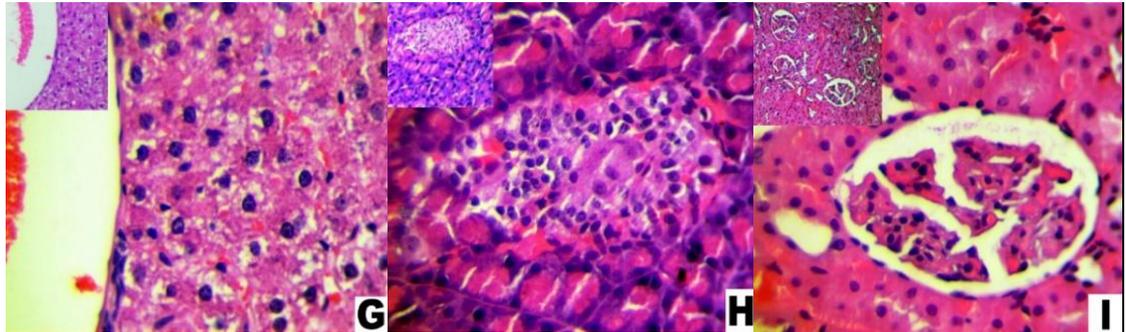


Figura 16. Avaliação Histopatológica grupo tratado com Glibenclamida 5mg/Kg (GLI 5): (G) – Fígado, (H) – Pâncreas, (I) – Rim. (HE 100x)

Jayakumar & Ganesh (2012) ao estudar o efeito hipoglicemiante do extrato de *Murraya koenigii*, ao longo de trinta dias de tratamento, observou na análise histológica, que o grupo tratado com glibenclamida 5mg/Kg apresentou uma restauração da população celular nas ilhotas de Langerhans.

O grupo tratado com metformina na dose de 50mg/kg, quando da avaliação do fígado, foi observado que os hepatócitos se encontravam aparentemente normais, com escassos focos de degeneração celular. O espaço porta apresentava formato compatível com a normalidade, no entanto, algumas poucas veias centrolobulares estavam hiperemiadas com a presença de poucas células polimorfonucleares na luz do vaso. No pâncreas, foi possível observar que os ácinos pancreáticos se apresentavam sem alterações morfológicas evidentes. As ilhotas de Langerhans apresentavam-se com formato discretamente irregular e volume reduzido, além de em menor número quando comparadas ao órgão controle. A análise do tecido renal evidenciou a presença de numerosos glomérulos renais, sendo que alguns destes apresentavam redução de volume glomerular e aumento do espaço de Bowman, além de presença de substância amorfa no interior do glomérulo sugestivo de hialinização glomerular parcial e tufos capilares atroficos. Escassas áreas com infiltrado inflamatório mononuclear foram observadas (Figura 17).

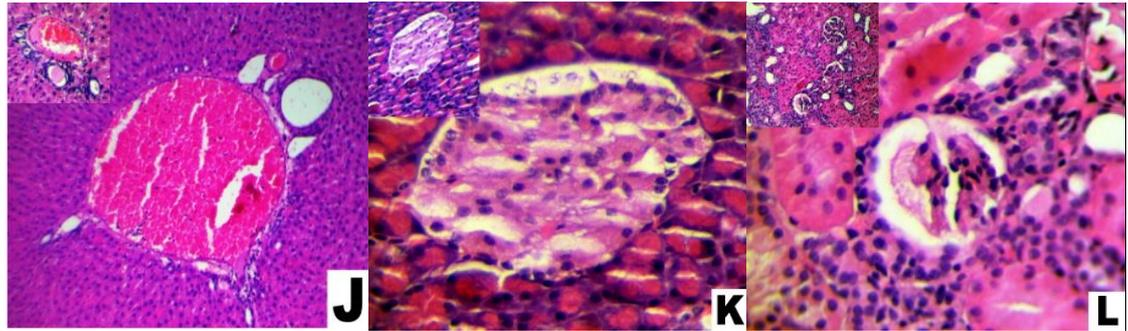


Figura 17. Avaliação Histopatológica grupo tratado com Metformina 50mg/Kg (MET 50): (J) – Fígado, (K) – Pâncreas, (L) – Rim. (HE 100x)

Para o grupo tratado com extrato MPE na dose de 100mg/kg, o tecido hepático e o espaço porta apresentaram-se sem variações de normalidade. Em algumas poucas veias centrolobulares foi observada hiperemia na luz do vaso com ausência de células inflamatórias nos vasos e escassas áreas de degeneração dos hepatócitos. No pâncreas, foi percebido que os ácinos pancreáticos se apresentavam sem alterações morfológicas evidentes. As ilhotas de Langerhans apresentavam-se com formato regular, porém, com volume reduzido e em menor número quando comparadas ao órgão controle. No tecido renal foi possível observar a presença de numerosos glomérulos renais, sendo que alguns destes apresentavam redução de volume glomerular e aumento do espaço de Bowman, além de presença de substância amorfa no interior do glomérulo sugestivo de hialinização glomerular parcial. Em algumas áreas foi percebido a redução parcial ou total do tufo capilar, sugerindo atrofia da estrutura. (Figura 18)

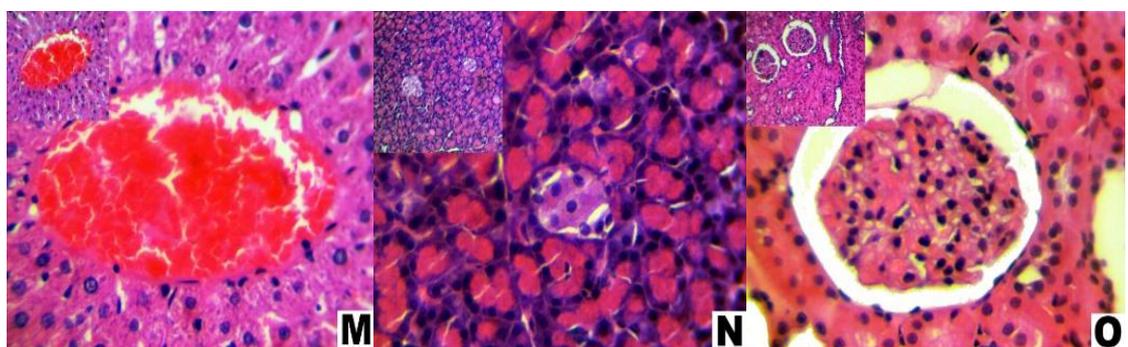


Figura 18. Avaliação Histopatológica grupo tratado com extrato MPE 100mg/Kg (MPE 100): (M) – Fígado, (N) – Pâncreas, (O) – Rim. (HE 100x)

Para o grupo tratado com extrato MPE na dose de 200mg/kg, quando da análise do fígado do animal, foi observado que os hepatócitos e o espaço porta apresentaram-se sem variações de normalidade. Em algumas poucas veias centrolobulares foi observada hiperemia na luz do vaso com a presença de escassas células inflamatórias nos vasos e em poucas áreas

focais notou-se hepatócitos em processo de degeneração, porém, menos significativo quando comparado aos outros grupos. No pâncreas, foi percebido que os ácinos pancreáticos se encontravam sem alterações morfológicas evidentes. As ilhotas de Langerhans apresentavam-se com aspecto normal e com formato regular, porém, com volume reduzido e em menor número quando comparadas ao órgão controle. A avaliação do rim do animal revelou a presença de numerosos glomérulos renais, sendo que alguns destes apresentavam redução de volume glomerular e aumento do espaço de Bowman, além de presença de substância amorfa no interior do glomérulo sugestivo de hialinização glomerular parcial. Em algumas áreas foi percebido a redução parcial ou total do tufo capilar, sugerindo atrofia da estrutura além de escassas áreas de infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 19).

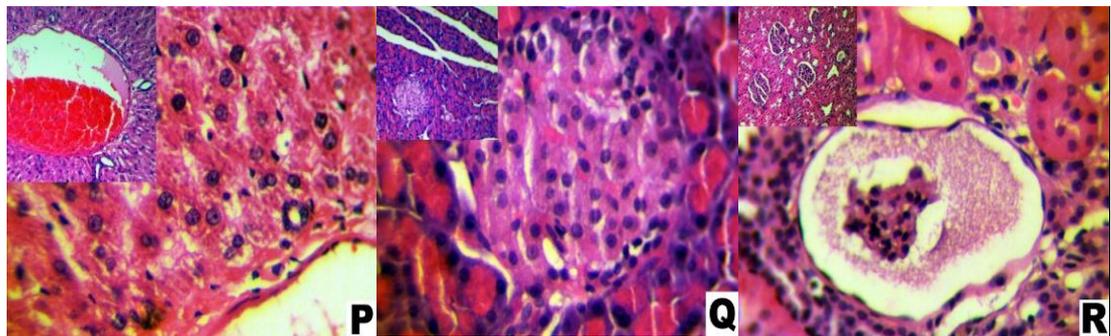


Figura 19. Avaliação Histopatológica grupo tratado com extrato MPE 200mg/Kg (MPE 200): (P) – Fígado, (Q) – Pâncreas, (R) – Rim. (HE 100x)

Para o grupo tratado com extrato MPE na dose de 400mg/kg foi observado que os hepatócitos apresentaram-se sem variações de normalidade, porém, em algumas áreas foi percebido a presença de degeneração celular. O espaço porta apresentou-se significativamente aumentado, com dilatação exuberante da veia centrolobular, que se encontrava hiperemiada e com a presença de polimorfonucleares na luz vascular. Na avaliação do pâncreas, os ácinos pancreáticos se encontravam sem alterações morfológicas evidentes. As ilhotas de Langerhans apresentavam-se com aspecto normal e com formato discretamente irregular, além de volume reduzido e em menor número quando comparadas ao órgão controle. No tecido renal foi percebido a presença de numerosos glomérulos renais com redução de volume glomerular e aumento do espaço de Bowman, além de presença de substância amorfa no interior do glomérulo sugestivo de hialinização glomerular parcial. Em algumas áreas foi percebido a redução parcial ou total do tufo capilar, sugerindo atrofia da estrutura (Figura 20).

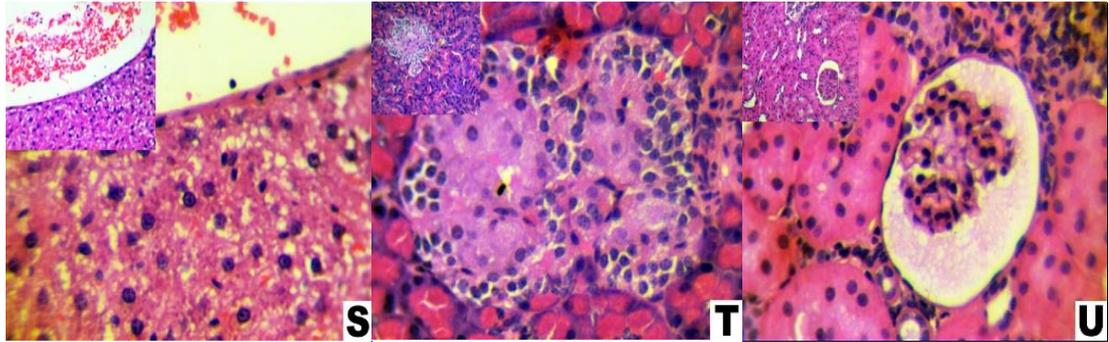


Figura 20. Avaliação Histopatológica grupo tratado com extrato MPE 400mg/Kg (MPE 400): (S) – Fígado, (T) – Pâncreas, (U) – Rim. (HE 100x)

Gautam e colaboradores (2012a) mostraram que animais tratados com o extrato de *M. paniculata* nas concentrações de (100, 200 e 400mg/Kg), apresentaram uma melhora na estrutura das células β pancreáticas ao longo do tempo de tratamento. Em achados histopatológicos de Subramanian & Arulselvan, (2007), estes autores relataram que o extrato de *M. koenigii*, apresenta um efeito de proteção hepática a medida em que se observou uma arquitetura celular normal e um aumento moderado de vesículas secretoras de grânulos das células pancreáticas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo nos permite concluir que:

Foram encontrados no extrato hidroalcolico das folhas de *Murraya paniculata* os seguintes compostos: ácido gálico, catequina, rutina, quercetina, entre outros compostos.

O extrato da planta *M. paniculata*, em testes de toxicidade, não causou morte nem apresentou sinais de toxicidade aguda nos grupos de animais testados.

O extrato da planta *M. paniculata* apresentou efeito hipoglicemiante em animais diabéticos induzidos por aloxano, em todas as doses testadas, e que a redução nos valores de frutossamina e hemoglobina glicada indicam um importante controle glicêmico no tratamento.

A administração oral do extrato MPE causou reduções significativas nos níveis de triglicerídeos e colesterol, sendo esse um achado importante para a prevenção de complicações da doença.

A administração do extrato MPE de maneira crônica, diminuiu os níveis séricos das enzimas hepáticas AST e ALT.

O tratamento com extrato MPE produziu um efeito sinérgico com glibenclamida e metformina.

O MPE na dose de 100mg/Kg foi capaz de reverter a hiperglicemia induzida pelo diazóxido via bloqueio dos canais de K⁺.

A análise histopatológica das amostras de fígado, pâncreas e rins mostrou que o tratamento crônico com MPE não produziu alterações morfológicas dignas de nota.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTER, K *et al.* Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment?. *British journal of clinical pharmacology*, v. 71, n. 3, p. 365-376, 2011.
- ALITHEEN, NB. (2012). Bioactivity studies and chemical constituents of *Murraya paniculata* (Linn) Jack. *International Food Research Journal* v.19,n.4, p.1307–12, 2012.
- ALMEIDA, RN *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.v.80,p.72-6, 1999.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION *et al.* Standards of medical care in diabetes—2010. *Diabetes care*, v. 33, n. Supplement 1, p. S11-S61, 2010.
- ANTÃO, CF; GALLEGO, R; CALDEIRA, J. Complicações Renais da diabetes mellitus. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*. v.23, p.577-94, 2007.
- ANTÔNIO, GD; TESSER, CD & MORETTI-PIRES, RO. Fitoterapia na atenção primária à saúde. *Revista de Saúde Pública*. 2014, v.48, n.3, p. 541-553, 2014.
- ARCANJO, DDR. *et al.* Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Biology*. v.72, n.3, p. 505-09, 2012.
- BASHIR, MI *et al.* Role of oral hypoglycemic agents in the management of type 2 diabetes mellitus during Ramadan. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, v. 16, n. 4, p. 503-507, 2012.
- BEARDSALL, K *et al.* Early insulin therapy in very-low-birth-weight infants. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 18, p. 1873-1884, 2008.
- BEARDSALL, K *et al.* Applied physiology of glucose control. *Current Pediatrics*. v. 13, p. 543-548, 2003.
- BERTOLUCI, MC *et al.* Disfunção endotelial no diabetes melito tipo 1. *Brazilian archives of endocrinology and metabolism*. v. 52, n. 2, p. 416-26, 2008.
- BODMER, M *et al.* Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes care*, v. 33, n. 6, p. 1304-1308, 2010.
- BOGNER, HR. *et al.* Integrated management of type 2 diabetes mellitus and depression treatment to improve medication adherence: a randomized controlled trial. *The Annals of Family Medicine*, v. 10, n. 1, p. 15-22, 2012.
- BOLIGON, AA *et al.* HPLC analysis and antimicrobial, antimycobacterial and antiviral activities of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Journal of Applied Biomedicine*, v.13, p. 7-18, 2015.

- BOURRON, O. *et al.* Biguanides and thiazolidinediones inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes through activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*, v. 53, n. 4, p. 768-778, 2010.
- BRASILEIRO, BG *et al.* Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.44, n.4, p. 629-636, 2008).
- BRITO, A. R. M. S. **Manual De Ensaio Toxicológicos In Vivo**. Ed. Unicamp, Campinas Brasil, p,122, 1994.
- BRUNKHORST, FM. *et al.* Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 2, p. 125-139, 2008.
- BRUNING, MCR; MOSEGUI, GBG & VIANNA, CMM. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & saúde coletiva*.v.17, n.10, p. 2675-2685, 2012.
- CAMPBELL, IW. Sulfonylureas and hypoglycemia. *Diabetic Hypoglycemia*, v. 2, n. 1, p. 3-10, 2009.
- CHEN, L; MAGLIANO, DJ & ZIMMET, PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 8, n. 4, p. 228-236, 2011.
- CHILELLI, NC; BURLINA, S & LAPOLLA, A. AGES, rather than hiperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: "A glycoxidation-centric" point of view. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. v.23, p. 913-19, 2013.
- COSTA, JFO *et al.* Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v.20, n.4, p. 502-505, 2010.
- COUSTAN, DR. Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry*. v.59, n.9, p.1310-21, 2013.
- CUNHA, LC *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v.19,n.2, p.403-11, 2009.
- CURTIS, GW; ROBBINS, SL; GLICKMAN, I. Studies on glycogen nephrosis in alloxan-treated diabetic rats. *The Journal of Experimental Medicine*., v. 85, p. 373-379, 1974.
- DAVEY, GC *et al.* Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of Diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology*. v.5,n.86, p. 1-16, 2014.
- DAVIS, S.N. Insulina, Agentes hipoglicemiantes orais e a Farmacologia do pâncreas endócrino. In: **GOODMAN e GILMAN**. As bases Farmacológicas da Terapêutica. 1º ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 1848 p, 2006.
- DISTEFANO, JK & WATANABE, RM. Pharmacogenetics of Anti-Diabetes Drugs. *Pharmaceuticals*. v.10, p.2610-46, 2010.

- DUFF, GL & STARR, H. Experimental alloxan diabetes in hooded rats. *Proc. Soc. Exper. Boil. and Med.*, v. 57, p.280-282, 1944.
- DUNCAN, BB *et al.* Doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: prioridade para enfrentamento e investigação. *Revista de Saúde Pública*. v.46,n.1, p. 126-134, 2012.
- EL-AMIN, M *et al.* Anti-diabetic effect of *Murraya koenigii* (L) and *Olea europaea* (L) leaf extracts on streptozotocin induced diabetic rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 26, p. 359-65, 2013.
- FERREIRA, CLR & FERREIRA, MG. Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde – análise a partir do sistema HiperDia. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*.v.53,n.1, 2009.
- GALAN, BE *et al.* Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *The New England Journal of Medicine*. v.358, n.24, p.2560-72, 2008.
- GAUTAM, MK *et al.* Toxicological Evaluation of *Murraya Paniculata* (L.) Leaves Extract on Rodents. *American Journal Pharmacology and Toxicology*. v.7,n.2, p.62-67,2012.
- GAUTAM, MK *et al.* Studies on the hypoglycemic effects of *Murraya paniculata* Linn. extract on alloxan-induced oxidative stress in diabetic and non-diabetic models. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. p.186-91, 2012a.
- GAUTAM, MK. *et al.* Antihyperglycemic and antioxidant potential of *Murraya paniculata* Linn. Leaves: a preclinical study. *Journal of Pharmacy Research*, v. 5, p. 1334-1337, 2012b.
- GEORGE, AE *et al.* Análise econômica de programa para rastreamento do diabetes mellitus no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v.39,n.3, p. 452-60, 2005.
- GEPTS, W & LECOMPTE, PM. The pancreatic islet in diabetes. *The American journal of Medicine*, v.70, n.1, p.105-113, 1981.
- GILL, NS; KAUR, N & ARORA, R. An overview on: *Murraya paniculata* Linn. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*. n.4, v.4, p.1-11, 2014.
- GRIBBLE, F.M. & REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues.Mechanisms, clinical implications, and drug interactions. *Journal of Diabetes and Its Complications*., v.15, p. 11-15, 2003.
- GROSS, JL *et al.* Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de endocrinologia e Metabologia*.v.46, n.1,2002.
- GUELHO, D; PAIVA, I & CARVALHEIRO, M. Diabetes mellitus-um <<continuum>> fisiopatológico. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*. v.8, n.1, p.44-49, 2013.
- HENQUIN, J.C. Pathways in β -cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes*., v. 53, p. 48-58, 2004.
- HÖLSCHER, C & LI, L. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. *Brain Research Reviews*. v.56, p.384-02, 2007.

HOUSSAY, BA; BRIGNONE, RF & MAZOCCO P. Alloxan and diabetes *Rev. Soc. Argent. Biol.*, v. 22, p.195-231, 1946.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, Diabetes Atlas, 6^a Edition, 2014. Disponível em: [http://www.idf.org/diabetesatlas/sites/default/files/IDFDiabetesAtlas-2014\(6rdedition\).](http://www.idf.org/diabetesatlas/sites/default/files/IDFDiabetesAtlas-2014(6rdedition).) Acessado em: 20 de Dezembro de 2014.

ITO, C *et al.* Chemical constituents of *Murraya siamensis*: Three coumarins and their anti-tumor promoting effect. *Phytochemistry* v.66,p.567–72, 2005.

JAYAKUMAR, SV & GANESH, SMK. The efficacy of aqueous methanolic extract of *Murraya koenigi* (L.) Spreng in alloxan induced diabetic albino rats. *Asian Journal of Plant Science and Research*. v.2,n.3, p.263-68, 2012.

KAHN, CR *et al.*, Diabetes Mellito. Tradução: Werneck, Bolner e Machado, 14^a edição, p. 575-576, Porto Alegre:Artmed, 2009.

KESARI, AN *et al.* Studies on the glycemic and lipidemic effect of *Murraya koenigi* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. P.305-311, 2007.

KESSLER, J. *et al.* Relationship between the histopatology of the endocrine-exocrine pancreas parenchyma and beta-cell function in the chinese hamster CHIG/ HAN subline. *Pancreas*, v.19, n.1, p.89-97, 1999.

KLIBER, A; SZKUDELSKI, T & CHICHOLOWSKA, J. Alloxan stimulation and Subsequent inhibition of insulin release from insitu perfused rat pancreas. *Journal of Physiology and Pharmacology.*, v. 47, p. 321-328, 1996.

KUMAR, PR, *et al.* Utility of Glycated Hemoglobin in Diagnosing Type 2Diabetes Mellitus: A Community-Based Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. v.95, n.6, p.2832-35, 2010.

LEAHY, J.L; BUMBALO, L.M. & CHEN, C. Diaxozide causes recovery of beta-cell glucose responsiveness in 90% pancreatectomized diabetic rats. *Diabetes*, v.43, n.2, p.173-179, 1944.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.

LENZEN, S. & MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical Pharmacology.*, v.42,n.7, p.1385-91, 1991.

LIBMAN, IM. Epidemiología de la diabetes mellitus en la infancia y adolescencia: tipo 1, tipo 2 y ¿diabetes "doble"? *Revista argentina de endocrinología y metabolismo*.v.46, n.3, p. 22-36, 2009.

LIN, EHB *et al.* Treatment adjustment and medication adherence for complex patients with diabetes, heart disease, and depression: a randomized controlled trial. *The Annals of Family Medicine*, v. 10, n. 1, p. 6-14, 2012.

LINGVAY, I *et al.* Insulin-based versus triple oral therapy for newly diagnosed type 2 diabetes which is better?. *Diabetes Care*, v. 32, n. 10, p. 1789-1795, 2009.

LITTLE, RR & ROBERTS, WL. A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *Journal of Diabetes Science and Technology*. v.3,n.3, p.446-51, 2009.

LU, WC *et al.* Identification of 5,7,30,40-tetramethoxyflavone metabolites in rat urine by the isotopelabeling method and ultrahigh-performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v.60, p.8123–8, 2012.

LUCIO, EMRA; ROSALEN, PL; SHARAPIN, N & SOUZA Brito ARM. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.9, n.10, p.23-5, 2000.

MANNA, TD. Not every diabetic child has type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr* (Rio J). v.83,n.5, p.S178-183, 2007.

MARCA, M.C.; LOSTE, A.; RAMOS, J.J. Effect of acute hyperglycaemia on the serum fructosamine and blood glycated haemoglobin concentrations in canine samples. *Veterinary Research Communications*, v. 24, p. 11-16, 2000.

MARIC, A. Metformin–more than ‘gold standard’ in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia Croatica*, v. 39, n. 3, p.95-104, 2010.

MATOS, LN *et al.* Prevalence of prediabetes in patients with metabolic risk. *Sao Paulo Medical Journal*. v.129, n.5, p.300-8, 2011.

MELAZZO, CM. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, 2004.

MENEZES, IRA *et al.* Chemical composition and evaluation of acute toxicological antimicrobial and modulatory resistance of the extract of *Murraya paniculata*. *Pharmaceutical Biology*. p.1-7, 2014.

MENEZES, IRA *et al.* Chemical composition and evaluation of acute toxicological, antimicrobial and modulatory resistance of the extract of *Murraya paniculata*. *Pharmaceutical Biology*, v.53, n.2, p. 185-191, 2015.

MESQUITA, SG *et al.*, Chemical constituents from leaves of *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Brazilian Journal of Farmacognosy*. v.18, n.4, p.563–8, 2008.

MINGRONE, G *et al.* Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, v. 366, n. 17, p. 1577-1585, 2012.

MOORE, M.C *et al.* Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.*, v. 17, p. 343-364, 2003.

MOREIRA, TMS, *et al.* O Brasil no contexto do controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.20,n.3, p. 435-440, 2010.

NARKHEDE, MB; AJMIRE, PV & WAGH, AE. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Murraya paniculata* leaves in experimental rodents. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. v.4, p.247-50, 2012.

NATHAN, D.M. *et al.* Translating the A1C Assay Into Estimated Average Glucose Values. *Diabetes Care*., v.31, p.1-16, 2008.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for testing of Chemicals, 1996.

PACKER L, RÖSEN P, TRITSCHLER HJ, KING GL, AZZI A. Antioxidants in diabetes management. **New York: Marcel Dekker; 2000.**

PANDE, MS; GUPTA, SBPN & PATHAK A. Hepatoprotective activity of *Murraya koenigii* Linn bark. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*. v.3,n.1, p.69-71, 2009.

PARK, BH *et al.* Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*., v. 210, p.1-6, 1995.

PUGLIESE, A. Advances in the etiology and mechanisms of type 1 diabetes. *Discovery Medicine*. v.18, n.98, p. 141-50, 2014.

RAHMATULLAH, M *et al.* *Murraya paniculata* (L.) Jack: A Potential Plant for Treatment of Toothache. *Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy*. v.2, n.3, p. 1-3, 2014.

RAVI, K; RAMACHANDRAN, B & SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*. v.75,p. 2717-31, 2004.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

REIS, JS *et al.* Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 52, n. 7, p. 1096-05, 2008.

REITMAN, S & FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. v. 28; p. 56-63, 1957.

ROGLIC, G. & UNWIN, N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes research and clinical practice*, v. 87, n. 1, p. 15-19, 2010.

ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N. Desenhos de pesquisa em Epidemiologia. In: _____ **Epidemiologia & Saúde**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI. 1999. p. 149-170.

SAKURAI, K.; OGISO, T. Effect of ferritin on DNA strand breaks in the reaction system of alloxan plus NADPH-cytochrome P450 reductase: ferritin's role in diabetogenic action of alloxan. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. v.18, p.262-266, 1995.

SALES, KLS; SOUZA, LA & CARDOSO, VS. Equilíbrio estático de indivíduos com neuropatia periférica diabética. *Fisioterapia e Pesquisa*, v. 19, n. 2, p. 122-127, 2012.

SARTORELLI, DS & CARDOSO, MA. Associação Entre Carboidratos da Dieta Habitual e Diabetes Mellitus Tipo 2: Evidências Epidemiológicas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. v.50, n.3, p.415-26, 2006.

SATO, R *et al.* Future perspective on pharmacogenomics of severe hypoglycemia associated with sulfonylureas: reply from the authors. *Pharmacogenomics*, v. 13, n. 1, p. 9-10, 2012.

SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. Tratamento e acompanhamento do Diabetes Mellitus: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: **Diagraphic**, p.152, 2006.

SBD, Diretrizes da sociedade Brasileira de diabetes, 2013-2014. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/images/pdf/diretrizes-sbd.pdf>, acessado em: 01 de outubro de 2014.

SBEM, SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. **Projeto Diretrizes. Diabetes Mellitus: Nefropatias**. São Paulo, 2004.

SELVIN, E *et al.*, Glycated Hemoglobin, Diabetes, and Cardiovascular Risk in Nondiabetic Adults. *The New England Journal of Medicine*. v.362,n.9, p.800-11, 2010.

STERI, R *et al.* Antidiabetic sulfonylureas modulate farnesoid X receptor activation and target gene transcription. *Future medicinal chemistry*, v. 2, n. 4, p. 575-586, 2010.

STOPA, SR *et al.* Self-reported diabetes in older people: comparison of prevalences and control measures. *Revista de Saúde Pública*. v.48, n.4, p. 554-62, 2014.

SHAFI, T *et al.* Serum fructosamine and glycated albumin and risk of mortality and clinical outcomes in hemodialysis patients. *Diabetes care*, p.1-12, 2012.

SHARKER, SMD.; SHAHID, IJ & HASANUZZAMAN, MD.. Antinociceptive and bioactivity of leaves of *Murraya paniculata* (L.) Jack, Rutaceae. *Brazilian Journal of farmacognosy*. vol.19, n.3, pp. 746-748, 2009.

SOUZA, ADL. *et al.* A new guaiane mannoside from a Eutypa-like fungus isolated from *Murraya paniculata* in Brazil. *Journal of The Brazilian Chemical Society*. v. 19 , n. 7, p.1321-1325, 2008.

SOUSA, MGM; COSTA, ALL & RONCALLI, AG. Clinical study of the oral manifestations and related factors in type 2 diabetics patients. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2011, vol.77, n.2, p. 145-152, 2011.

SUBRAMANIAN, SP & ARULSEVAN, P. Beneficial effects of *Murraya koenigii* leaves on antioxidant defense system and ultra structural changes of pancreatic β -cells in experimental diabetes in rats. *Chemico-Biological Interactions*. v.165, p.155-64, 2007.

SUKARI, MA *et al.* COUMARINS FROM MURRAYA PANICULATA(RUTACEAE). *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. v.14,n.1, p.1-5, 2010.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, v. 50; n. 6; p. 537-546, 2001.

TAHA, C & KLIP, A. The insulin signaling pathway. *Journal of Membrane Biology*. v. 169, p.1-12, 1999.

TAHARA, N *et al.* Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects. *Cardiovascular therapeutics*, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2012.

THARAVANIJ, T *et al.* Clinical use of fructosamine in islet transplantation. *Cell transplantation*. v. 18, n. 4, p. 453-458, 2009.

TEMBHURNE, S. V. *et al.* Biochemical and physiological responses of fruit juice of *Murraya koenigii* L in 28 days repeated dose toxicity study. *Int J. Pharm Tech Res*, v. 1, n. 4, p. 1568-75, 2009.

TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor *Annals of Clinical Biochemistry*. v. 6; p. 24 – 25, 1969.

TRIVELLI, LA; RANNEY, HÁ; LAI, HT. *The New England Journal of Medicine* 1971; v. 284, p. 353-357.

VALIATTI, FB *et al.* Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 55, n. 2, p. 106, 2011.

WATANBE, D.; NAKARA, H.; AKAGI, K.; ISHII, T.; MIZUGUCHI, H.; NAGASHIMA, Y.; OKANIWA, A. Oral glucose tolerance test and determination of serum fructosamine level in beagle dogs. *The Journal of Toxicological Sciences*, 29:33-36, 2007.

WIERNSPERGER, M. E. & BAILEY, J. C.. The antihyperglycaemic effect of metformin. *Drugs*, Stanford – USA, v.58, n.1, p.31-39, 1999.

WILMOT, E & IDRIS, I. Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and management. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. v.5, n.6, p. 234-44, 2014.

WU, TS *et al.* Coumarins from the leaves of *Murraya paniculata*. *Phytochemistry*.v.27, p.2357-58, 1988.

YADAV, S; VATS, V; DHUNNOO, Y & GROVER, JK. Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Murraya koenigii* leaves in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 111-116, 2002.

ZHANG, PY. Cardiovascular disease in diabetes. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. v.18, p.2205-14, 2014.

ZHAO, L.; LI, Z.; KULLIN, M.; BORG, L.A.H.; KARLSSON, F.A. Alterations in net glucose uptake and in pancreatic B-cell GLUT-2 transport induced by diazoxide and secretory stimuli. *Journal of Endocrinology*, v.185, p.295-99, 2005.

ZHAO, ZH *et al.* Variations of susceptibility to alloxan induced diabetes in the rabbit. *Hormone and Metabolic Research*. v.19,n.11, p.534-7, 1987.

ZOU, J *et al.* Protective effect of total flavonoids extracted from the leaves of *Murraya paniculata* (L.) Jack on diabetic nephropathy in rats. *Food and Chemical Toxicology*. v.64, p. 231-37, 2014.

APÊNDICE

Quadro 1 - Parâmetros das atividades do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo e descrição para avaliação dos parâmetros.

Função	Parâmetro	Descrição para avaliação do Parâmetro
SNC - estimulante	Hiperatividade	Observar se os animais estão hiperativos e excitados
	Irritabilidade e agressividade	Assoprar o animal e tocá-lo levemente para examinar reação.
	Tremores	Observar se estão presentes ou não.
	Convulsão	Observar a presença ou não.
	Piloereção	Verificar se há eriçamento de pelos.
	Movimento intenso das vibrissas	Verificar aumento no movimento das vibrissas.
SNC - depressora	Hipnose	Verificar se os animais dormem agrupados.
	Ptose	Olho fechado ou semi-fechado mesmo após estímulo.
	Sedação	Observar se o animal está quieto, sem movimento, mas se tocado responde ao estímulo.
	Anestesia	Ausência de resposta a estímulo doloroso.
	Ataxia	Observar se há irregularidades das ações musculares ou falta de coordenação destas ações.
	Reflexo de endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que o animal volta à sua posição normal em até 15 segundos
	Catatonía	Colocar o animal apoiado apenas sobre trem posterior com as patas anteriores apoiadas em uma barra horizontal (bastão de vidro), os que permaneceram na barra por 30 segundos são considerados catatônicos e os que não permanecerem como não catatônicos.
	Resposta ao toque diminuída	Tocar o animal com uma pinça e examinar as respostas.
	Reflexo corneal	Aproximar uma pinça, lentamente, até os olhos do animal, sem encostá-la, e verificar se o animal tem o reflexo de fechá-los.
	Reflexo auricular	Observar a posição da orelha, quanto mais próxima da cabeça, menor é o reflexo. Estalar os dedos para observar os reflexos.
Outros comportamentos	Bocejo excessivo	Verificar se o animal apresenta aumento no ato de bocejar.
	Limpeza	Verificar se o animal apresenta comportamento de autolimpeza aumentado.
	Levantar	Avaliar se o animal consegue levantar apoiado apenas nas patas traseiras.
	Escalar	Avaliar se o animal consegue escalar a grade superior da gaiola.
	Vocalizar	Verificar se os sinais sonoros emitidos pelos animais estão aumentados.
	Contorções abdominais	Movimento vermiforme do corpo.
	Abdução das patas do trem posterior	Verificar se o animal está com a postura normal ou se o trem posterior está caído (intensidade, modo de andar).
SNA	Diarréia	Verificar presença ou não.
	Constipação	Verificar ausência de bolos fecais.
	Defecação aumentada	Verificar aumento dos bolos fecais.
	Respiração forçada	Observar se a respiração do animal está aumentada.

Lacrimejamento	Examinar nos olhos dos animais a presença de secreção que em geral apresentam tonalidade avermelhada.
Micção	Verificar se há aumento de micção.
Salivação	Verificar se há aumento da salivação.
Cianose	Alteração da coloração da pele – azulada.
Tono muscular	Retirar o animal da gaiola e verificar se a musculatura está flácida.
Força para agarrar	Avaliar a capacidade do animal em permanecer seguro a um lápis ou mesmo a grade superior da gaiola.

APÊNDICE B - Determinações Bioquímicas de glicemia, colesterol total, triglicerídeos, as transaminases hepáticas AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase), frutossamina e hemoglobina glicada.

Glicemia (TRINDER modificado, 1969)

Preparo da amostra: A amostra de sangue deve ser obtida após jejum de no mínimo 8 horas. Usar plasma ou soro colhido com um anticoagulante contendo um inibidor da glicólise. As amostras de sangue não contendo antiglicolítico devem ser centrifugadas imediatamente após a colheita, e o plasma ou soro separados das células ou coágulo.

Procedimento: Separar três tubos de ensaio e proceder como a seguir:

1. Branco: Adicionar 1,0mL do reagente “1” (Contém tampão 50mmol/L, pH 7,5; fenol ≥ 1 mmol/L; glicose oxidase ≥ 11000 U/L; peroxidase ≥ 700 U/L; 4-aminoantipirina 290 μ mol/L; azida sódica 7,5 mmol/L; estabilizadores e surfactantes).
2. Teste: Adicionar 0,01mL da amostra e 1,0mL do reagente “1”.
3. Padrão: Adicionar 0,01mL do padrão (contém glicose 100 mg/dL e biocida não tóxico) e 1,0mL do reagente “1”.

Misturar vigorosamente e incubar em banho maria a 37°C durante 15 minutos. O nível da água deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorvâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. A cor é estável 30 minutos.

$$\text{Cálculo: Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 100$$

Triglicerídeos (TRINDER modificado, 1969)

Preparo da amostra: Usar soro ou plasma com EDTA, quando a amostra é colhida em heparina pode-se obter resultado falsamente baixo. A heparina promove a ativação da lipoproteína lípase, fazendo com que a concentração dos triglicérides se reduza gradativamente em amostras contendo heparina.

Procedimento: Separar três tubos de ensaio e proceder como a seguir:

1. Branco: Adicionar 1,0mL do reagente “1” (Contém tampão 50mmol/L, pH 7,0; íons magnésio 4mmol/L; 4-clorofenol 2,70mmol/L; 4-aminoantipirina 300µmol/L; ATP 1,8 mmol/L; lipoproteína lípase ≥ 1400 U/L; glicerolquinase 1000 ≥ U/L; glicerolfosfato oxidase ≥ 1500 U/L; peroxidase ≥ 900 U/L e azida sódica 0,095%).
2. Teste: Adicionar 0,01mL da amostra e 1,0mL do reagente “1”.
3. Padrão: Adicionar 0,01mL do padrão (contém triglicérides 200mg/dL e azida sódica 0,045%) e 1,0mL do reagente “1”.

Misturar e colocar em banho maria a 37°C durante 10 minutos. O nível da água deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 505 nm ou filtro verde (490 a 520), acertando o zero com o branco. A cor é estável 60 minutos.

$$\text{Cálculo: Triglicérides (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

Colesterol total (TRINDER modificado, 1969)

Preparo da amostra: Usar soro, não utilizar amostras fortemente hemolisadas. O uso de anticoagulantes como citrato, oxalato EDTA pode-se obter resultado falsamente baixo.

Procedimento: Separar três tubos de ensaio e proceder como a seguir:

1. Branco: Adicionar 1,0 mL do reagente “1” (Contém tampão 50mmol/L, pH 7,0; fenol 24 mmol/L; colato de sódio 500µmol/L; azida sódica 15 mmol/L; 4-aminoantipirina 500µmol/L; colesterol esterase ≥ 250 U/L; colesterol oxidase ≥ 250 U/L; peroxidase ≥ 1000 U/L).
2. Teste: Adicionar 0,01mL da amostra e 1,0mL do reagente “1”.
3. Padrão: Adicionar 0,01mL do padrão (contém azida sódica 15 mmol/L) e 1,0mL do reagente “1”.

Misturar e colocar em banho maria a 37°C durante 10 minutos. O nível da água deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar as absorbâncias do teste e padrão em 500 nm ou filtro verde (490 a 510), acertando o zero com o branco. A cor é estável 60 minutos.

$$\text{Cálculo: Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 200$$

AST/ALT(REITMAN & FRANKEL modificado, 1957)

Preparo da amostra: Usar soro ou plasma colhido com EDTA ou heparina. O soro deve ser isento de hemólise, pois a concentração das aminotransferases é consideravelmente maior nos eritrócitos.

Preparo da solução de hidróxido de sódio 0,4M: Transferir todo o líquido de hidróxido de sódio (40 mL), solução concentrada 10M, para um balão volumétrico de 1000 mL. Acertar o volume com água destilada ou deionizada isenta de gás carbônico (recém-fervida). Guardar em frasco plástico.

Procedimento: Separar dois tubos de ensaio e proceder como a seguir:

1. AST: Adicionar 0,5 mL do substrato AST (contém 0,2M de L-aspartato, 0,002M Alfa cetoglutarato, tampão de fosfatos 0,1M pH 7,4) colocar em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Adicionar 200µL, homogeneizar e incubar a 37°C, durante 30 minutos. Adicionar 0,5 mL de reagente de cor (solução 0,001M de 2,4 dinitrofenilhidrazina), homogeneizar e deixar em repouso, à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Adicionar 5 mL hidróxido de sódio 0,4M misturar e deixar repousar durante 2 minutos, à temperatura de 20-30°C. Ler as absorvâncias em espectrofotômetro em 505nm ou filtro verde, acertando o zero com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procurar os valores em unidades AST.
2. ALT: Adicionar 0,5 mL do substrato ALT (contém 0,2M de L-alanina, 0,002M Alfa cetoglutarato, tampão de fosfatos 0,1M pH 7,4) colocar em banho maria a 37°C durante 2 minutos. Adicionar 100µL, homogeneizar e incubar a 37°C, durante 30 minutos. Adicionar 0,5 mL de reagente de cor (solução 0,001M de 2,4 dinitrofenilhidrazina), homogeneizar e deixar em repouso, à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Adicionar 5 mL hidróxido de sódio 0,4M misturar e deixar repousar durante 2 minutos, à temperatura de 20-30°C. Ler as absorvâncias em espectrofotômetro em 505nm ou filtro verde, acertando o zero com água destilada. Utilizando a curva de calibração, procurar os valores em unidades ALT.

Preparo da curva de calibração: Tomar 5 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

Tubo nº	1	2	3	4	5
	MI	mL	mL	mL	mL
Padrão	----	0,05	0,1	0,15	0,2
TGP substrato	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
TGO substrato	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3
Água destilada ou deionizada	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Reagente de cor (nº 2)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Misturar e deixar na temperatura ambiente durante 20 minutos. Decorridos os 20 minutos, acrescentar a cada tubo 5 mL de hidróxido de sódio 0,4M e misturar por inversão. Deixar repousar por 2 minutos e ler os tubos de 1 a 5 contra um branco constituído de água destilada, ajustado a 100% de transmitância, em 505 nm ou filtro verde.

Traçado da curva de calibração: Traçar a Curva de Calibração correlacionando as leituras obtidas com os valores em Unidades/mL, expressos na tabela abaixo, utilizando papel linear (para absorbâncias) ou monolog (para transmitância).

Tubo nº	1	2	3	4	5
ALT (Unidades F.R./mL)	Zero	28	57	97	150
AST (Unidades F.R./mL)	Zero	24	61	114	190

Expressão dos resultados em Unidades do Sistema Internacional (U.I):

Transaminases (U.I/L) = transaminases unidades F.R./ mL x 0,482

DETERMINAÇÃO DA FRUTOSAMINA

A nova metodologia para a determinação da frutossamina tem como princípio a ligação da glicose aos grupamentos das proteínas formando uma base de Schiff (aldimina), que após um rearranjo molecular transforma-se em uma cetoamina estável denominada genericamente frutossamina. Em pH alcalino, a frutossamina é convertida à forma enólica, que reduz o nitroazul de tetrazólio (NBT) a uma cor azul púrpura. Nesta prova, outros agentes redutores podem estar presentes na amostra causando interferência no ensaio. No novo reagente enzimático colorimétrico para a determinação de frutossamina foi incorporada a uricase, um agente clarificador à base de detergente com o objetivo de minimizar os interferentes presentes na amostra. A mensuração da diferença de absorvância em espectrofotômetro, após incubação por 10 a 15 minutos é proporcional a concentração de frutossamina na amostra (WATANBE et al., 2007).

Hemoglobina glicada (TRIVELLI modificado, 1971)

Preparo da amostra: Usar sangue total colhido com EDTA, quando a amostra é colhida em heparina pode-se obter resultado falsamente elevado. Amostras lipêmicas ou ictericas interferem na dosagem, fornecendo resultados falsamente elevados, em função disso, o procedimento a seguir descrito deverá ser aplicado somente quando a amostra estiver turva, lipêmica ou icterica.

1. Pipetar e em um tubo 1,0mL da amostra bem homogeneizada. Marcar o nível de 1,0mL no tubo.
2. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos. Retirar o plasma sem ressuspender as hemácias.
3. Adicionar 3,0 mL de NaCl 150mmol/L (0,85%). Centrifugar e remover o sobrenadante sem ressuspender as hemácias.
4. Ressuspender as hemácias com 3,0mL de NaCl 150mmol/L (0,85%). Centrifugar. Acertar o volume para a marca de 1,0mL, retirando o excesso de sobrenadante.
5. Homogeneizar bem e utilizar para preparar o hemolisado.

Preparo do hemolisado: em um tubo 12 x 75 adicionar 0,4mL de Hemolisante (contém ácido bórico 600mmol/L e azida sódica 14,6mmol/L) e 0,1mL da amostra. Agitar fortemente

por 20 segundos e esperar 5 minutos. Se a hemólise for incompleta (o líquido no tubo se mostrará turvo), centrifugar e usar sobrenadante.

Antes de iniciar a cromatografia assegurar-se que o hemolisado, o tampão (contém tampão fosfato 36mmol/L, pH 6,7 e biocida não tóxico) e as colunas estejam a mesma temperatura do ambiente. Nunca realizar a cromatografia se estiverem em temperaturas diferentes do ambiente no qual se realizará a cromatografia.

Preparo da coluna: Retirar a tampa superior da coluna (contém resina de troca iônica equilibrada em tampão fosfato pH 6,7), introduzir o bastão fazendo movimentos giratórios descendentes e ascendentes para ressuspender a resina. Remover imediatamente a tampa inferior, colocar a coluna em um tubo de ensaio (alto o suficiente para que a ponta da coluna não toque o líquido no tubo) e esperar que todo o líquido penetre na resina. A partir daí, a coluna estará pronta para uso e a cromatografia deverá ser iniciada imediatamente. Jamais efetuar a cromatografia em temperatura inferior a 16°C ou superior a 30°C. (Medir a temperatura do líquido que drenou da coluna para correção do resultado)

Cromatografia: Adicionar 0,05mL do hemolisado sobre a resina, de modo que não haja ressuspensão da mesma, evitando a formação de bolhas de ar. Esperar que todo o hemolisado penetre na resina.

Transferir a coluna para um tubo de ensaio limpo e seco (alto o suficiente para que a ponta da coluna não toque o líquido no tubo), marcado com o número “1” e adicionar lentamente, com a ponta da pipeta tocando a parede da coluna, 3,5mL de tampão. A eluição da Hemoglobina glicada (Hb - G) se completa quando todo o tampão penetra na resina.

Desprezar a coluna.

Colorimetria: homogeneizar o conteúdo do tubo número “1” (Hb - G) e usá-lo para a colorimetria sem qualquer tratamento adicional.

Para um tubo limpo e seco, marcado com o número “2” (Hb - Total), pipetar 7,0mL de água deionizada, adicionar 0,02mL do hemolisado e misturar.

Determinar as absorvâncias dos tubos número “1” (Hb - G) e número “2” (Hb - Total) em 415nm ou filtro azul (405 a 430) acertando o zero com água destilada. A cor é estável quatro horas.

$$\text{Cálculo: Hb - G (\%)} = \frac{\text{Absorvância do tubo "1" (Hb - G)}}{\text{Absorvância do tubo "2" (Hb - Total)} \times 5} \times 100$$

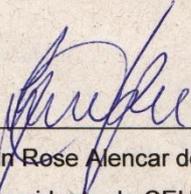
ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil
propg@urca.br - www.urca.br/ceua

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado “Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Murraya paniculata* em modelos de diabetes experimental induzido por aloxano” Processo N° 00129/2013.2 foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA. Protocolo.



Irwin Rose Alencar de Menezes
Presidente do CEUA/URCA

CRATO-CE
2013

ANEXO B – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS AO MESTRADO



Original article

Ethnopharmacological study of *Stryphnodendron rotundifolium* in two communities in the semi-arid region of northeastern Brazil

Dayanne Rakelly de Oliveira^a, Washington Soares Ferreira Júnior^b,
Vanessa de Carvalho Nilo Bitu^c, Patricia Gonçalves Pinheiro^a,
Cícero Diego Almino Menezes^a, Francisco Elizau do Brito Junior^a,
Ulysses Paulino de Albuquerque^b, Marta Regina Kerntopf^a,
Henrique Douglas Melo Coutinho^{d,*}, Roselei Fachinetto^e, Irwin Rose Alencar Menezes^a

^aLaboratório de Farmacologia e Química Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^bLaboratório de Etnobotânica Aplicada, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^cFaculdade Leão Sampaio Juazeiro do Norte, CE, Brazil

^dLaboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^eUniversidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Full Length Research Paper

Modulatory activity and chemical profile of a hydroalcoholic extract of *Crateva tapia* L.

Daniela L. de V. Cabral¹, Valérium T. N. A. Castro¹, Henrique Douglas Melo Coutinho², Saulo Relison Tintino², Cícero Diego Almino Menezes², Irwin R. A. Menezes², Ulysses Paulino de Albuquerque³ and Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim^{1*}

¹Laboratory of Natural Products, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, CEP 50740-521, Recife-PE, Brazil.

²Laboratory of Medicinal Chemistry and Pharmacology (LFQM), Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Cel. Antonio Luis 1161, Crato-CE, Brazil.

³Laboratory of Applied Ethnobotany, Biology Department, Botany Area, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. CEP: 52171-900. Recife-PE, Brazil.

Received 30 July, 2014; Accepted 12 January, 2015