



NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER

CARACTERIZAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIINFLAMÁTORIA DOS
COMPONENTES DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE
EUGENIA UNIFLORA SOBRE A EXPRESSÃO DO DIABETES, NO
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES ESPONTÂNEO TIPO 1
(CAMUNDONGOS NOD)

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER

CARACTERIZAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIINFLAMÁTORIA DOS
COMPONENTES DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE
EUGENIA UNIFLORA SOBRE A EXPRESSÃO DO DIABETES, NO
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES ESPONTÂNEO TIPO 1
(CAMUNDONGOS NOD)

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na área
de concentração Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER.

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Sch86c Schumacher, Nayara Simon Gonzalez, 1990-
Caracterização da propriedade antiinflamatória dos
componentes do extrato aquoso das folhas de *Eugenia
uniflora* sobre a expressão do diabetes, no modelo
experimental de diabetes espontâneo tipo 1
(camundongos NOD) / Nayara Simon Gonzalez
Schumacher. -- Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador : Ricardo de Lima Zollner.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Eugenia uniflora*. 2. Diabetes mellitus tipo 1. 3.
Camundongos NOD. 4. Antioxidantes. I. Zollner, Ricardo
de Lima, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of anti-inflammatory property of the
components of the aqueous extract of *Eugenia uniflora* leaves on diabetes expression in
experimental model of spontaneous type 1 diabetes (NOD)

Palavras-chave em inglês:

Eugenia uniflora

Diabetes Mellitus, Type 1

NOD mice

Antioxidants

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ricardo de Lima Zollner [Orientador]

Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Giuseppina Negri

Data de defesa: 26-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

NAYARA SIMON GONZALEZ SCHUMACHER

ORIENTADOR(A): PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

MEMBROS:

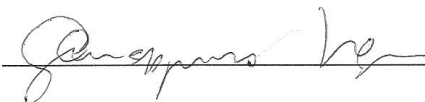
1. PROF(A). DR(A). RICARDO DE LIMA ZOLLNER



2. PROF(A). DR(A). DENISE ENGELBRECHT ZANTUT WITTMANN



3. PROF(A). DR(A). GIUSEPPINA NEGRI



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26 de fevereiro de 2015

RESUMO

A linhagem de camundongos NOD (non obese diabetic) é utilizada como modelo experimental de Diabetes mellitus tipo 1 (DM-1), por desenvolver espontaneamente a doença similar ao observado em humanos. São inúmeros os mecanismos propostos para ruptura da tolerância imunológica no DM-1, como a predisposição genética do indivíduo somadas as interferências ambientais como o estresse e a alimentação, parecem contribuir para a ação dos mecanismos autoimunes. As pesquisas por novas substâncias com potencial antiinflamatório presentes nas plantas medicinais, são inspiradas e motivadas pelas propriedades destas e que podem auxiliar no tratamento das doenças inflamatórias, como no caso do DM-1. Relatos da literatura, nem sempre indexada, sugerem que a *Eugenia uniflora* é um produto natural que contém inúmeros compostos fenólicos em sua composição e o chá de suas folhas tem sido estudado em possuir atividade antiinflamatória, antioxidante e antidiabética, melhorando o controle do diabetes. No presente estudo investigamos quais os melhores solventes (água, etanol e metanol/acetona) para extração de compostos bioativos da folha de pitanga, e avaliamos a atividade antioxidante dos solventes pelas técnicas DPPH, FRAP, ABTS e ORAC, fenóis totais, identificação de taninos hidrolisáveis, composição centesimal e investigação de três compostos fenólicos (ácido elágico, ácido gálico e rutina) nas folhas. Nossos resultados sugerem que o extrato aquoso em comparação com o etanol e metanol/acetona, apresenta atividade antioxidante e fenóis totais superiores, sendo desta forma o extrato aquoso utilizado como tratamento de DM-1 em camundongos NOD. Vimos que seu consumo crônico é capaz de diminuir o índice de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas e consequentemente a diminuição da expressão do diabetes. Além disso, é possível que compostos presentes nas folhas de *E. uniflora* possuam propriedades antiinflamatórias que preservam as células β pancreáticas e

mantenham os níveis de insulina sérica. Sendo assim, o estudo visa investir no desenvolvimento de novas drogas com potencial de interferir na evolução da doença, atuando desta forma como suporte no tratamento do diabetes autoimune.

Termos de Indexação: *Eugenia uniflora*; Diabetes mellitus tipo 1; Camundongos NOD; antioxidantes.

ABSTRACT

NOD mice (non-obese diabetic) is used as an experimental model of type 1 Diabetes mellitus (DM-1) that spontaneously develop the disease with similarities to observed in humans. Several mechanisms are proposed to breakdown immune tolerance in DM-1, such as the genetic predisposition of the individual, together with environmental factors such as stress and diet, favoring the onset of autoimmune mechanisms. The search for new substances with potential anti-inflammatory present in the medicinal plants inspire and motivate research focusing in the treatment of inflammatory diseases, including DM-1. Literature reports, not always indexed, suggest that *Eugenia uniflora* is a natural product that contains numerous phenolic compounds in its composition and tea from its leaves has been studied in possessing anti-inflammatory, antioxidant and anti-diabetic, improving diabetes control. In the present study we investigated what the best solvents (water, ethanol and methanol/acetone) for the extraction of bioactive compounds of cherry leave, and evaluate the antioxidant activity of solvents for technical DPPH, FRAP, ABTS and ORAC, total phenols, tannins identification hydrolysable, centesimal composition and investigation of three phenolic compounds (ellagic acid, gallic acid and rutin) in the leaves. Our results suggest that the aqueous extract in comparison with ethanol and methanol/acetone features antioxidant activity and higher total phenols, and thus the aqueous extract used as a DM-1 treatment in NOD mice. We have seen that the chronic consumption can reduce the inflammatory infiltrate index in pancreatic islets and consequently the reduction of diabetes expression. Moreover, it is possible that the components present in the *E. uniflora* leaves have anti-inflammatory properties that preserve the pancreatic β cells and maintains serum insulin levels. Thus, the study aimed to invest in

the development of new drugs with the potential to interfere with the disease, thereby acting as a support in the treatment of autoimmune diabetes.

Indexing Terms: *Eugenia uniflora*; type 1 Diabetes mellitus; NOD mice; antioxidant.

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	1
1.2. Camundongos NOD (non-obese diabetic).....	3
1.3. O diabetes e o processo de oxidação.....	5
1.4. Radicais Livres e Antioxidantes.....	8
1.5. <i>Eugenia uniflora</i>	10
1.6 <i>Eugenia uniflora</i> e taninos.....	11
2. HIPÓTESE.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Ensaios Químicos e Atividades antioxidantes das folhas de <i>E. uniflora</i>.....	17
4.1.1. Processamento das folhas de <i>E. uniflora</i>	17
4.1.2. Extração dos Compostos Fenólicos.....	18
4.1.2.1. Extrato Aquoso.....	18
4.1.2.2. Extrato Etanol.....	18
4.1.2.3. Extrato Metanol/Acetona.....	19
4.1.3. Ensaios da Atividade Antioxidante.....	19

4.1.3.1. Sequestro do radical orgânico DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).....	20
4.1.3.2. Capacidade de redução do metal-FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	20
4.1.3.3. Captura do radical livre ABTS (2,2'-AZINO-BIS(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid).....	21
4.1.3.4 Capacidade de absorção do radical Oxigênio- ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>).....	21
4.1.4. Fenóis totais.....	22
4.1.5. Composição centesimal.....	22
4.1.6. Fibra bruta.....	24
4.1.7. Identificação de taninos.....	25
4.1.7.1. Método Qualitativo.....	25
4.1.7.2. Método Quantitativo para taninos hidrolisáveis.....	25
4.1.8. Análise Cromatográfica (HPLC).....	26
4.2. Ensaio biológico: camundongos NOD tratados com as folhas de <i>E. uniflora</i>.....	28
4.2.1. Animais.....	28
4.2.2. Grupos Experimentais.....	28
4.2.3. Controle biológico do extrato aquoso das folhas de <i>E. uniflora</i>	30
4.2.4. Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais.....	30
4.2.5. Cortes histológicos do Pâncreas.....	31
4.2.6. Coloração HE (Hematoxilina e Eosina).....	32
4.2.7. Avaliação Histológica do Pâncreas.....	32

4.2.8. Teste de Tolerância à Glicose.....	35
4.2.9. Detecção dos níveis de insulina sérica.....	35
4.2.10. Análise de Proteína – Hartree.....	36
4.2.11. Análise GSH- Glutathiona Reduzida.....	36
4.2.12. Dosagem das enzimas hepáticas ALT e AST.....	37
4.2.13. Imunofluorescência Indireta.....	37
4.3. Análise estatística.....	48
4.4. Formatação do texto.....	39
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Ensaio Químico e Atividades antioxidantes das folhas de <i>E. uniflora</i>	41
5.1.1. Atividade Antioxidante pelas técnicas DPPH, FRAP, ABTS e ORAC nos extratos Aquoso, Etanol e Metanol/Acetona.....	41
5.1.2. Fénols Totais dos extratos Aquoso, Etanol e Metanol/Acetona.....	42
5.1.3. Identificação da Composição Centesimal e Fibras das Folhas de <i>E.uniflora</i> ...	46
5.1.4. Identificação de Taninos.....	46
5.1.4.1. Método qualitativo e quantitativo para taninos hidrolisáveis.....	46
5.1.5. Caracterização Cromatográfica (HPLC).....	50
5.2. Ensaio biológico: camundongos NOD tratados com as folhas de <i>E. uniflora</i>.....	54
5.2.1. Consumo de água e do extrato aquoso de <i>E. uniflora</i>	54
5.2.2. Efeito do tratamento com extrato Aquoso de <i>E.uniflora</i> sobre a manifestação do diabetes auto imune espontâneo.....	54

5.2.3. Efeito do tratamento com extrato aquoso <i>E. uniflora</i> sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas.....	57
5.2.4. Teste de Tolerância à Glicose em camundongos NOD e BALB/c.....	57
5.2.5. Efeitos do extrato Aquoso sobre a concentração de insulina sérica.....	61
5.2.6. Níveis de glutathione presentes no fígado e rim dos camundongos NOD.....	61
5.2.7. Níveis de enzimas hepáticas no soro dos camundongos NOD e BALB/c.....	62
5.2.8. Imunofenotipificação de células insulina+, glucagon+, somatostatina+, GLP-1+.....	66
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	83
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
9. REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO I – Identificação da <i>Eugenia uniflora</i>.....	93
ANEXO II - Comissão de Ética no Uso de Animais.....	94

Meus agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades e permitir

que eu seguisse pelo caminho que sempre sonhei.

Aos meus queridos e amados pais Luis e Tânia, por abrirem

a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz

mais brilhante que poderiam encontrar: o estudo.

Ao meu noivo Neto, minhas irmãs, sobrinhas e

cunhados por todo carinho e dedicação.

Enfim, toda minha família a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

Meu orientador, Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner, por todos os ensinamentos, apoio e

valiosa orientação ao longo destes anos, e também pela confiança em meu trabalho,

Daniella, Talita, Natália, Virgínia e Cinthia pela ajuda em todos os momentos, pelo

companheirismo absoluto, amizade e palavras de estímulo.

Senhora Margarida, minha segunda mãe, por toda ajuda, dedicação e companheirismo.

Ao biólogo do laboratório, Dr. Luís Gustavo Romani Fernandes, pela atenção de sempre.

Aos professores Dr. Marcelo Prado, Dra. Gabriela, Dra. Juliana pela disponibilidade do

laboratório e uso de equipamentos e aluna Fabiola pela atenção e dedicação.

FAPESP, pela concessão de verba para o projeto de pesquisa, processo: 2011/06559-4 e

CAPES, pela concessão da bolsa de estudos do mestrado.

LISTA DE ABREVIATURA

AAPH	2,2'-azobis (2-amidino-propano), di-hidrocloreto
ABTS	2,2'- AZINO-BIS(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)
AGE	Produto final de glicação avançada
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Células apresentadoras de antígenos (Antigen-presenting cell)
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Soro Albumina Bovina (Bovin Serum Albumin)
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
DM	Diabetes mellitus
DM-1	Diabetes mellitus tipo 1
DM-2	Diabetes mellitus tipo 2
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GAD	Glutamato descarboxilase
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
HE	Hematoxilina e eosina
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IFN-γ	Interferon-gama

IL	Interleucina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (Major histocompatibility complex)
NAD+	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NK	Natural killer
NOD	Diabético não obeso (Non-obese Diabetic)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Tampão fosfato salina, ph 7.3 (Phosphate buffer saline)
SOD	Superóxido Desmutase
SPF	Livre de patógenos comuns (Specific Pathogen Free)
TNF	Fator de necrose tumoral (Tumor necrosis fator)
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

- Figura 1:** Folha de *Eugenia uniflora* caracterizadas no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). (A) Folha da *E. uniflora*; (B) Folha da *E. uniflora* seca e moída. 17
- Figura 2:** Porcentagem de sequestro do radical DPPH nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona (A), os resultados são expressos em porcentagem de sequestro. Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona (B), os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ amostra. As diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$. 43
- Figura 3:** Análise da atividade antioxidante pelo método ABTS (A) e ORAC (B) nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona, os resultados são expressos em $\mu\text{M Trolox/g}$ amostra. As diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$. 44
- Figura 4:** Fenóis totais nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de mg EAG/g amostra e as diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$. 45
- Figura 5:** Detecção de Taninos hidrolisáveis nos extratos de *E. uniflora*. (A) Extrato aquoso. (B) Extrato etanol. (C) Extrato metanol/acetona. Os extratos eram preparados nas seguintes diluições (1/5, 1/10, 1/50 e 1/100; respectivamente). 48
- Figura 6:** Comparação da presença de tanino hidrolisado entre a diluição 1/10 nos três extratos: aquoso, etanol e metanol/acetona. 48
- Figura 7:** Quantificação dos taninos hidrolisáveis nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de mg AG/g amostra e as diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$. 49

Figura 8: Quantificação dos compostos fenólicos nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de mg/L amostra. A: Ácido elágico; B: Ácido gálico e C: Rutina. As diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.	51
Figura 9: A) Cromatograma completo do extrato aquoso das folhas de <i>E. uniflora</i> ; B) Cromatograma dos compostos identificados, ácido elágico (1); ácido gálico (2) e rutina (3); C) Espectro do extrato aquoso dos compostos identificados.	52 e 53
Figura 10: Consumo semanal de água e extrato aquoso dos camundongos NOD. Consumo de água $33,1 \pm 5,0$ mL/animal; consumo de extrato aquoso $39,7 \pm 8,0$ mL/animal. Teste estatístico <i>t-Student</i> , com marcador estatístico "a".	55
Figura 11: Frequência cumulativa da incidência do DM-1 nos camundongos NOD submetidos ao tratamento com extrato aquoso de <i>E. uniflora</i> ou controle. 60%(18/30) dos camundongos do grupo controle apresentaram diabetes, ao passo que a incidência no grupo tratado com o extrato aquoso de pitanga foi de 40,7%(11/27), apresentando diferença de 19,3% entre as frequências.	56
Figura 12: Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongo NOD controle (n=5), NOD <i>E. uniflora</i> (n=5) e NOD diabético (n=5). Número total de ilhotas analisadas em cada grupo = 300.	58
Figura 13: Gráfico representativo do Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD dos grupos controle, <i>E. uniflora</i> e diabético. Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. NOD controle (n=5); diabético (n=5); NOD <i>E. uniflora</i> (n=5). 300 ilhotas foram analisadas por grupo. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.	59
Figura 14: Glicose sanguínea (mg/dL) durante o teste de tolerância à glicose nos camundongos NOD referente aos grupos Diabético, Controle, <i>E. uniflora</i> e BALB/c.	60

Figura 15: Análise estatística da área sob a curva de glicose em camundongos NOD dos grupos Diabético, Controle, <i>E. uniflora</i> e camundongos BALB/c. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$.	60
Figura 16: Concentração de insulina sérica pelo método enzimático ELISA em camundongos NOD do grupo controle (n=15), diabético (n=15) e <i>E. uniflora</i> (n=15). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.	63
Figura 17. A) Gráfico representativo da glutathiona reduzida presente no fígado de camundongos NOD nos grupos controle, diabético e <i>E. uniflora</i> . B) Glutathiona presente no rim de camundongos NOD fêmeas do grupo controle, diabético e <i>E. uniflora</i> . Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.	64
Figura 18. Gráfico representativo da concentração sérica de ALT (A) e AST (B). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.	65
Figura 19: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células insulina+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e <i>E. uniflora</i> (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.	68
Figura 20: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e <i>E. uniflora</i> (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$; b/c: $p < 0,001$; a/c: $p < 0,001$.	69
Figura 21: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e <i>E. uniflora</i> (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas	70

por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$.

Figura 22: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células GLP-1+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *E. uniflora* (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$.

71

Prancha I: Imagem representativa de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em diferentes graus de infiltração celular. A) Grau 0 (0%); B) Grau 1 (< 25%); C) Grau 2 (25 - 80%); D) Grau 3 (> 80%); E) Grau 4 (100%).	34
Prancha II: Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células insulina+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) <i>E. uniflora</i> e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.	68
Prancha III: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) <i>E. uniflora</i> e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.	69
Prancha IV: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) <i>E. uniflora</i> e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.	70
Prancha V: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células GLP-1+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) <i>E. uniflora</i> e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.	71

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Gradiente de eluição das fases móveis A e B na análise de cromatografia.	27
Tabela 2: Composição centesimal e fibras brutas da folha de <i>E. uniflora</i> . Os resultados são expressos para carboidrato, proteína, cinzas, umidade e lipídeos em um total de 100% e porcentagem de fibras com média $\pm$ desvio padrão.	47

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes mellitus

O Diabetes mellitus é um grupo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum à hiperglicemia crônica que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, resultando na deficiência da secreção e/ou ação da insulina (1). Considerando as características etiológicas do diabetes e seus mecanismos desencadeantes, essa doença é classificada em quatro tipos: Diabetes mellitus gestacional; outros tipos específicos de diabetes, incluindo diabetes secundário ou associado a outras doenças; Diabetes mellitus tipo 2 (DM-2); Diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) (2).

O Diabetes mellitus auto imune ou DM-1 representa 5 a 10% dos casos de diabetes, caracterizado por distúrbio endócrino no qual o metabolismo de glicose se altera devido a deficiência de insulina após destruição das células β pancreáticas responsáveis pela sua produção e liberação (3). Tem como característica geral início agudo, afetando frequentemente crianças e adolescentes, mas os fatores desencadeantes dessa doença ainda não foram totalmente elucidados (4, 5).

No DM-1 ocorre processo inflamatório nas ilhotas pancreáticas, no qual as células apresentadoras de antígenos (APCs) expressam moléculas de MHC classe II/ I e coestimulantes que ativam clones específicos de $CD4^+$ e $CD8^+$. A ativação do $CD8^+$ leva a uma ação citotóxica e os $CD4^+$ a produção de várias citocinas, tais como interferon ($IFN\ \alpha$, β , γ), fator de necrose tumoral (TNF), IL-2, entre outras. Esses linfócitos desencadeiam a destruição seletiva das células β produtoras de insulina, resultando na deficiência desse

hormônio (6, 7)

Outro aspecto importante no envolvimento dos linfócitos na determinação do DM-1 é a produção e liberação de citocinas, as quais alternariam a função das células β e contribuiria para destruição das ilhotas pancreáticas por sua ação citotóxica induzindo a apoptose das células β (6).

Embora os linfócitos T auto-reativos participem ativamente na patogênese do diabetes auto imune, existem outros auto-anticorpos que caracterizam a doença, como os anticélula da ilhota (ICA- *Islet-Cell Antibody*), que são anticorpos policlonais que reagem com as células α , β e γ da ilhota pancreáticas. Os anti-insulina (IAA- *Anti- Insulin Auto-Antibody*) decorrente do uso prolongado de insulina ou espontâneo, no qual o próprio portador da doença produz o anticorpo IAA. E o Anti-GAD, proteína glutamato descarboxilase (GAD) encontrada na membrana das células β , sendo o principal marcador no DM-1, o qual converte ácido glutâmico em ácido γ -aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (2, 6, 8, 9)

As ilhotas pancreáticas são circundadas por teia de fibras frouxas nervosas e por células de Schwann não mielinizadas. Antes de invadir as ilhotas, as células do sistema imune se acumulam fora das ilhotas em associação muito próxima a rede de células de Schwann e com o avanço da insulite essas células são destruídas. A associação da destruição das células de Schwann com o desenvolvimento do diabetes ainda não está confirmado (10, 11).

Diversos mecanismos na ruptura da tolerância imunológica têm sido propostos, como fatores genéticos e ambientais parecem favorecer para o desenvolvimento do DM-1. A análise da patogênese do diabetes em seres humanos é limitada e por essa razão o uso de modelo experimental animal é importante. O conhecimento adquirido e que sustenta as hipóteses do

desenvolvimento do DM-1 decorrem de estudos empregando modelos animais geneticamente predispostos a essa doença, como os camundongos da linhagem NOD (diabético não obeso).

1.2. Camundongos Nod (*Non obese diabetic*)

Os camundongos NOD representam um modelo experimental que desenvolvem espontaneamente o DM-1. A linhagem NOD foi inicialmente desenvolvida no Japão após o cruzamento de sublinhagem CTS (propensa à catarata) com uma linhagem não consanguínea ICR. O primeiro camundongo NOD a desenvolver a DM-1 espontâneo foi observado em uma fêmea e a partir de cruzamentos seletivos de sua prole, a linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no Laboratório SHIONOGI ABURAH como modelo animal para estudo do DM-1 (12, 13).

No Brasil, a primeira colônia de camundongos NOD foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), a partir de colônias provenientes do laboratório INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França) (14).

A linhagem NOD estabelecida e mantida no Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresenta prevalência de diabetes entre 60-90% nas fêmeas e 5-20% nos machos (14). Fatores ambientais, tais como condições de habitação, saúde e dieta, podem influenciar também no desenvolvimento do diabetes nesses animais (15).

O DM-1 clínico neste modelo animal desenvolve-se espontaneamente entre a 12^a e 24^a semana de vida, mais frequentemente nas fêmeas. Polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observadas nestes animais, acompanhados de uma

rápida perda de peso (11, 13).

A fisiopatologia do diabetes autoimune na linhagem NOD possui duas fases, a insulítica ou pré-diabética e a segunda caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina e consequente manifestação do diabetes. As células mononucleares encontradas nesses períodos são linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, podendo ocorrer também, a presença de células dendríticas, células NK, linfócitos B e $CD11c^+$, as quais progridem e invadem as ilhotas pancreáticas (16, 17).

Durante o desenvolvimento da doença no NOD as células T $CD4^+$ e o $CD8^+$ exercem um papel sinérgico, uma vez que o diabetes só se desenvolverá na presença de ambos os subtipos (18, 19). Shizuru *et al*, (1988) (20), verificaram que a eliminação das células $CD4^+$, através da utilização de anticorpos monoclonais anti- $CD4^+$ suprime a insulite e, consequentemente, o aparecimento do diabetes no camundongo. Portanto os linfócitos T $CD4^+$ podem ter um papel essencial na progressão do diabetes.

Já o papel do linfócito $CD8^+$ além dos mecanismos de destruição das ilhotas pancreáticas, esses linfócitos exercem função citotóxica através da liberação de grânulos de perforinas e granzimas, bem como a indução da apoptose através da interação Fas/FasL. O $CD8^+$ parece estar presente também na fase efetora final da patogênese do diabetes, independente da presença de linfócitos T $CD4^+$. Dessa maneira os linfócitos T autoreativos e a ineficiência de sua eliminação podem desempenhar um papel fundamental no aparecimento do diabetes nesse modelo animal (21, 22).

Os mecanismos que desencadeiam o processo imunológico no DM-1 ainda não foram totalmente elucidados. A expressão de peptídeos imunogênicos na célula β , induzidos por toxinas e infecções virais, poderia auxiliar no aumento das reações auto imunes. Alguns

estudos, investigam também, a hipótese de que a predisposição genética do indivíduo, fatores ambientais e a ação danosa dos radicais livres parece favorecer o desencadeamento de mecanismos auto imunes gerando um processo inflamatório no DM-1 (23).

1.3. O diabetes e o processo de oxidação

A progressão de diversas doenças está associada a modulação do estresse oxidativo nos mamíferos (24). No diabetes, evidências recentes sugerem que o estresse oxidativo pode estar relacionado ao efeito inibitório da insulina (25).

O estresse oxidativo pode ser definido como um estado de desequilíbrio entre os fatores que geram radicais livres e dos fatores que protegem o organismo, os antioxidantes. A maior compreensão do papel oxidativo no Diabetes mellitus é importante para novas estratégias de tratamento (26).

O Diabetes mellitus auto imune assim como o adquirido, está associado ao estresse oxidativo e hiperglicemia. A hiperglicemia prolongada no diabetes leva ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Além disso, a hiperglicemia induz a ativação das proteínas quinases (PK-C), o aumento de formação de derivados glicosilados e estimula um aumento no fluxo de glicose na via aldose-redutase, resultando em acúmulo de sorbitol. Esses seriam os principais mecanismos metabólicos pelos quais a hiperglicemia causa as complicações da diabetes (26).

A ativação da via polióis pela glicose é associado à alteração dos níveis de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD⁺), que resulta na modificação de proteínas por

glicosilação não enzimática e também está associado a diminuição dos níveis de glutathione (27).

O DM-1 gera, também, processo inflamatório, o qual aumenta as espécies reativas de oxigênio e a deficiência das defesas antioxidantes. O excesso das espécies reativas de oxigênio causam alterações na estrutura e funções das proteínas, membrana lipídica e nos ácidos nucleicos, levando eventualmente essas células à morte (28).

Diferentes mecanismos podem estar envolvidos no aumento da oxidação no organismo. A oxidação da glicose, acredita-se ser uma das principais vias de produção dos EROs no diabetes. Essa oxidação leva a formação das AGEs (produtos finais da glicação avançada), as quais podem ser gerada pelos rearranjos de Amadori, pelo ácido ascórbico e outros carboidratos incluindo a frutose e intermediários metabólicos (29).

Os AGEs são proteínas ou lipídios que se tornam glicosados após a exposição a açúcares oxidados e contribuem para o desenvolvimento do DM. Sua ação leva a modificação de proteínas intracelulares envolvidas na regulação gênica e em moléculas da matriz vizinha, interferindo na sinalização entre a matriz e a célula, causando disfunção celular. Algumas proteínas como a albumina, ativam os receptores de AGEs os (RAGEs), estimulando a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 e 6, fator de crescimento I, fator de necrose tumoral α , prostaglandinas e fator estimulador de colônias de granulócitos (30, 31) .

Níveis elevados de AGEs têm sido documentado em vasos retinianos e em nervos periféricos de portadores de diabetes e em modelo animal, agindo na redução da velocidade de condução nervosa e no fluxo sanguíneo periférico (32, 33).

A ligação das AGEs nos receptores RAGEs, na superfície celular, induz ao estresse oxidativo caracterizado pelo aumento do fator de transcrição NF-kB que promove a produção

de óxido nítrico. O óxido nítrico pode interagir com as EROs gerando o peroxinitrito, um oxidante potente que acredita-se ser um mediador das lesões nas células β das ilhotas pancreáticas (34, 35).

Poucos são os estudos que avaliam o estresse oxidativo no DM-1. Dominguez *et, al.* (36) avaliaram 24 pacientes adolescentes, após o início clínico do DM-1, quando o controle metabólico já estava restaurado, verificaram concentrações elevadas de malonaldeído (MDA) plasmático, produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, em relação ao grupo controle, sugerindo que os radicais livres possam exercer papel tóxico no início da doença. Esse efeito tóxico elevado também foi avaliado em pacientes de 2 a 22 anos de idade que apresentavam DM-1. Demonstraram também que pacientes recém diagnosticados apresentam níveis baixos de glutathione em relação ao grupo controle, com declínio progressivo durante a doença.

Em estudo de Hata *et, al.* (2006) (37) mostraram que pacientes com 5 anos de doença (DM-1) apresentam aumento no 8-OHdG (8-hidroxi-2'- deoxiguanosina), marcador de estresse oxidativo, com relação ao controle. Reis (2006) (38) verificou, em estudo na população brasileira, que indivíduos com dois anos de doença e recebendo insulina, apresentaram aumento dos níveis entre a produção de ROS por granulócitos no DM-1 em relação aos indivíduos não diabéticos. Por outro lado, Vessby *et, al.* (2002) (39) avaliaram um grupo de pacientes diabéticos insulinizados e indivíduos não diabéticos (sadios), verificaram que não houve diferença estatísticas entre os grupos com marcadores de estresse oxidativo. Contudo, ainda não está totalmente elucidado os fatores que desencadeiam o estresse oxidativo e que levam a doenças. Neste sentido sabe-se que para controlar o processo oxidativo existem moléculas chamadas antioxidantes capazes de inibir a oxidação e servirem como possível

tratamento e/ou auxílio no DM-1.

1.4. Radicais Livres e Antioxidantes

Os radicais livres são definidos como átomos capazes de existir independente contendo um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital. A presença deste elétron não pareado altera a reatividade química do átomo ou molécula tornando-se mais reativo. Possuem meia-vida curta, mas são altamente instáveis podendo causar danos por reagir com diferentes moléculas (40).

O termo radical livre ou espécie reativa de oxigênio (EROs)/nitrogênio (ERNs) são utilizados para identificar os radicais que se apresentam como agentes oxidantes. Essas EROs/ERNs incluem o peróxido de hidrogênio, radical hidroxilo, superóxido, entre outras (41).

A oxidação do oxigênio é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. As espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo celular liberados durante o processo, o qual é utilizado para converter nutrientes provenientes da nossa alimentação em energia (42).

As EROs produzidas ajudam na manutenção da homeostase celular, como também, em baixas concentrações, atuam de maneira benéfica nas defesas do organismo contra agentes infecciosos, na formação de ATP através da ADP na mitocôndria, na produção de oxigenases (lipooxigenase e ciclooxigenase) para formação de prostaglandina e leucotrienos e na regulação do crescimento celular (40).

A produção em excesso das espécies reativas de oxigênio ou a deficiência dos

mecanismos de defesa do organismo podem ser prejudiciais induzindo a oxidação de proteínas, carboidratos, enzimas, lipídeos de membrana e DNA, gerando desequilíbrio que leva ao estresse oxidativo (41, 42).

Os antioxidantes são moléculas presentes em baixas concentrações, que inibem o processo oxidativo, eliminando os radicais livres, agindo como agentes de redução. Os principais mecanismos de ação dos compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores que neutralizam ou eliminam os EROs, ERNs e a ligação de íons metálicos que são necessários para a produção das espécies oxidantes (43). Os mecanismos antioxidantes podem envolver processos enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes podem ser classificados como endógenos, como a glutathione peroxidase, a catalase e o superóxido desmutase (SOD). E também os exógenos, provenientes da nossa alimentação como vitaminas A, C, E, minerais, flavonoides, entre outros (34).

Os componentes celulares não possuem proteção integral pelos antioxidantes endógenos, sendo necessários antioxidantes exógenos obtidos na dieta. Assim, a presença destes componentes, sejam endógenos ou presentes na dieta, podem ser aliados importantes na manutenção da saúde (44).

Os compostos fenólicos provenientes de fontes vegetais são componentes antioxidantes muito estudados. Os compostos fenólicos são metabólicos secundários divididos em: ácidos fenólicos, fenilpropanóide, flavonoides, taninos condensados e hidrolisados, e sua distribuição depende do vegetal, podendo apresentar variação na própria espécie (45, 46).

Sob o ponto de vista nutricional os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes capazes de inibir a oxidação. Essas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição.

Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido ao anel aromático presente na estrutura destas substâncias (47).

Os danos causados aos componentes celulares contribuem para a degeneração das células e indução de doenças. O Diabetes mellitus leva a diminuição dos antioxidantes endógenos no organismo, ocasionando o aumento dos radicais livres. Os compostos antioxidantes provenientes da nossa alimentação podem ser uma alternativa para o tratamento do Diabetes mellitus. Neste sentido a busca por alimentos que possuam esses compostos químicos vem se intensificando.

1.5 *Eugenia uniflora*

O gênero *Eugenia L.* pertencente à família *Myrtaceae*, possui mais de 500 espécies, onde 400 delas encontram-se no Brasil sendo utilizadas como plantas medicinais. A *Eugenia uniflora* (*E. uniflora*), conhecida popularmente como pitangueira, está dentro deste gênero sendo encontrada em regiões com clima tropical e subtropical, onde é valorizada pelo seu fruto (48). Com relação às atividades terapêuticas da pitangueira, o chá de suas folhas tem sido estudado como eficiente no tratamento de diversas enfermidades e tem aplicação na medicina popular como hipotensor, antigota, estomático e hipoglicemiante (49).

Estudos realizados por meio da decocção e infusão das folhas secas de *E. uniflora* mostraram efeito antiinflamatório sem efeito de toxicidade aguda nos animais (50). Ensaios farmacológicos realizados com o extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora* permitiram encontrar os flavonóides (quercitrina, quercetina, miricitrina e miricetina), que inibem a atividade da enzima xantina-oxidase (51).

Velazquez *et, al.* (2003) (52) avaliaram o extrato metanólico de seis plantas medicinais encontradas no Paraguai e verificando as suas propriedades antioxidantes. Sendo uma delas a *E. uniflora*, cujo extrato protegeu contra peroxidação lipídica enzimática e não enzimática de membranas microssomal de ratos e aumentaram a atividade de remoção de radicais livres superóxidos e radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Arai *et, al.* (1999) (53) observaram nas frações separadas das folhas de *E. uniflora* a inibição da digestão de açúcares e gorduras, reduzindo a absorção gastrointestinal destes nutrientes, o que pode ser eficiente para diabetes e obesidade.

1.6 *Eugenia uniflora* e taninos

Taninos são compostos fenólicos que fazem parte dos metabólitos secundários encontrados em plantas e são conhecidos por apresentarem ação biológica. Apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a capacidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (54).

Os taninos são divididos em duas classes na identidade dos núcleos fenólicos, como: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os hidrolisáveis são formados por derivados de ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos) esterificados com glicose. E os taninos condensados (não hidrolisáveis), são resultantes da condensação de catequinas ou leucocianidina (55).

Diversos estudos realizados com chás de origem vegetal revelam a ação antioxidante dos taninos, que são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos

taninos (hidrolisados e condensados) são devidas a três mecanismos: a complexação com íons metálicos, a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e por último a capacidade de complexar com proteínas e polissacarídeos (56).

A ligação entre taninos e proteínas ocorre, provavelmente, através de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e determinados sítios das proteínas.

Monteiro *et, al.* (2005) (55) relataram a quantificação dos taninos por diversos tipos de ensaios, como: precipitação de metais/proteínas e por métodos colorimétricos, sendo os colorimétricos mais comuns. Alguns ensaios colorimétricos são usados para quantificar grupos de taninos específicos, como no caso de taninos hidrolisáveis.

Aurichio *et, al.* (2007) (57) identificaram flavonóides e taninos no extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de *E. uniflora*, sendo a porcentagem de taninos de 20,06%, correspondendo a 2,96% na droga. Estes compostos possuem propriedades supressores de radicais peroxila, sendo responsáveis pela atividade antimicrobiana e desta forma contribuindo para a atividade antioxidante observada. Já Fiuza *et, al.* (2008) (58) quantificaram no pó das folhas de *E. uniflora* o teor de fenóis totais (9,22 %), o teor de taninos (5,08 %) e o teor de flavonóides totais de 0,53 % e concluíram que a presença destes compostos na *E. uniflora* justifica a atividade biológica como antioxidantes.

Além dos efeitos benéficos que o tanino possui como efeito antioxidante, atuando no sequestro de radicais livres, estudos relatam também seu efeito antinutricional, reduzindo a digestibilidade de proteínas, inibindo a ação de enzimas digestivas (tripsina, lipase e α -amilase) e interferência na absorção de ferro (59, 60).

2. HIPÓTESE

Hipótese de trabalho: A espécie *Eugenia uniflora* por suas propriedades antioxidantes/antiinflamatórias modula a inflamação na ilhota pancreática reduzindo a expressão de diabetes no modelo experimental de diabetes tipo1 (camundongos NOD).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas da *E. uniflora* (pitanga) e seu consumo crônico no desenvolvimento do DM-1 em camundongos NOD (non-obese diabetic) fêmeas.

3.2. Objetivos específicos:

Avaliar:

- A composição centesimal e atividade antioxidante da folha seca de *E. uniflora* nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona.
- Identificação de componentes majoritários nos extratos da folha de *E. uniflora*.
- O efeito da administração crônica do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* sobre a incidência da expressão do DM-1 espontâneo em fêmeas de camundongo NOD e a classificação do infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas.
- Os níveis de insulina sérica juntamente com o teste de tolerância a glicose e de glutathiona reduzida (GSH) no fígado e rins dos camundongos NOD.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Ensaios Químicos e Atividades antioxidantes das folhas de *E. uniflora*

4.1.1. Processamento das folhas de *E. uniflora*

As amostras selecionadas para compor o presente projeto não constam na relação de espécies ameaçadas de extinção, de acordo com o IBAMA-CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora ((61)). A identificação das amostras era realizada com auxílio da engenheira agrônoma Profa. Dra. Laura Melleti, do Instituto Agronômico de Campinas (IAC - Campinas, SP) conforme ANEXO I (pág.93).

As folhas da pitanga (*E. uniflora*) foram secas em estufa de circulação de ar (MARCONI, Piracicaba/SP) a 50°C/48 horas, trituradas até a obtenção de um pó e armazenadas sobre refrigeração a 8°C.



Figura 1: Folha de *Eugenia uniflora* caracterizadas no Instituto Agronômico de Campinas (IAC). (A) Folha da *E. uniflora*; (B) Folha da *E. uniflora* seca e moída.

4.1.2. Extração dos Compostos Fenólicos

O processo de extração das folhas de *E. uniflora* era realizado nas folhas secas e moídas utilizando três diferentes solventes nas mesmas concentrações (0,04g/mL), sendo eles água, etanol e metanol/acetona. Os extratos eram armazenados em vidro âmbar até o momento das análises da atividade antioxidante.

4.1.2.1. Extrato Aquoso

No preparo do extrato aquoso utilizou-se 1g folha seca e 25mL de água, os quais eram autoclavados por 20 minutos a 121°C. O chá formado pelo processo de autoclavagem era filtrado em papel filtro e transferido para balão volumétrico de 25mL (62). A amostra era armazenada em vidro âmbar sob a temperatura de 8°C até o momento das análises da atividade antioxidante (63).

4.1.2.2. Extrato Etanol

A 1g de folha seca era adicionado 15mL de etanol 60%, mantendo em banho-maria a 70 °C por 1 hora, essa mistura era agitada a cada 15 minutos. Após esse tempo o extrato era filtrado em papel filtro e reservado o conteúdo. Ao resíduo era adicionado mais 10mL de etanol 60%, mantendo novamente em banho-maria a 70 °C por 1 hora e filtrado em seguida. Os extratos obtidos após a filtragem eram transferidos para um balão volumétrico de 25mL e seu volume final acertado com água destilada. A amostra era armazenada em vidro âmbar sob a

temperatura de 8°C até o momento das análises da atividade antioxidante (64).

4.1.2.3. Extrato Metanol-Acetona

O preparo do extrato Metanol - Acetona conforme Larrauri *et. al.* (65), pesou-se 1g folha e adicionou 15mL de metanol 50% permanecendo em repouso por 60 minutos. Após esse tempo, a amostra era centrifugada a 9948 g durante 20 minutos / 22°C. O sobrenadante era transferido para um balão de volumétrico de 25mL e o resíduo da folha ressuspensos em 10mL de acetona 70% por mais 60 minutos. A amostra era centrifugada novamente a 9948 x g durante 20 minutos. O sobrenadante era transferido para o mesmo balão volumétrico e o volume final de 25mL era acertado com água destilada. A amostra era armazenada em vidro âmbar sob a temperatura de 8°C até o momento das análises da atividade antioxidante.

4.1.3. Ensaios da Atividade Antioxidante

Os extratos aquosos, metanol/acetona e etanol do extrato de pitanga (*E. uniflora*) eram submetidos a quatro diferentes ensaios (DPPH; FRAP; ABTS; ORAC) para averiguar qual apresenta maior atividade antioxidante. Para esses ensaios, as amostras dos três extratos (aquoso, etanol e metanol/acetona) eram diluídas nas seguintes concentrações 0.4, 0.5, 0.8 e 1.3mg/mL. Os ensaios de atividade antioxidante seguiram os seguintes passos:

4.1.3.1. Sequestro do radical orgânico DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl):

O ensaio DPPH seguiu Brand-Williams *et, al.* (66), com algumas modificações, onde era preparado o DPPH(0,06mM) dissolvido em álcool metílico. Eram misturados 25µL dos extratos da folha com 1mL de solução DPPH 0,06mM e após 30 min era feita a leitura em espectrofotômetro (SpectraMAX 190®, CA, EUA) no comprimento de onda de 515nm. A leitura da curva era linear entre 0,004 e 0,024 mg/mL de DPPH. Os resultados eram expressos em porcentagem de sequestro desse radical.

4.1.3.2. Capacidade de redução do metal-FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*):

O ensaio seguiu Benzie & Strain (67) e Pulido *et, al.* (68), com algumas modificações. Preparou-se soluções estoques de tampão acetato 300mM (3.1g acetato de sódio - $C_2NaO_2 \cdot 3H_2O$ /16mL ácido acético glacial - $C_2H_4O_2$) pH 3.6; TPTZ 10 mM (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) em solução de ácido clorídrico 40nM (HCl), cloreto férrico 20mM ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) e sulfato ferroso 2mM ($FeSO_4$). No momento do uso era preparado a solução de FRAP contendo 50mL de tampão de acetato, 5mL de TPTZ e 5mL de cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$). Os extratos da folha (30µL) eram misturados com 90µL de água e 900µL solução FRAP, homogeneizado e mantido em banho-maria a 37°C por 30 min. Sua leitura era feita a 595nm em espectrofotômetro. A leitura da curva era linear entre 500 e 2.000 µM de sulfato ferroso ($FeSO_4$ 2mM). Os resultados eram expressos em equivalente de $FeSO_4$ /g.

4.1.3.3. Captura do radical livre ABTS (2,2'-AZINO-BIS (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)) (adaptado de Larrauri *et, al.* e Nenadis *et, al.*(65, 69)):

A solução estoque de ABTS (192 mg ABTS+ 50mL de água) era misturada com 88µL de persulfato de potássio 140mM - Na₂S₂O₈ (378,4 mg persulfato de potássio + 10mL água) e mantida em repouso por 16 horas no escuro em temperatura ambiente. Após esse período era diluído 1mL dessa mistura em aproximadamente 55mL de álcool etílico até obter a absorbância de 0,70nm ± 0,05nm a 734nm em espectrofotômetro. Os extratos da folha (10µL) eram misturados com 1mL de solução ABTS por 6min e sua leitura era feita a 734nm. A leitura da curva era linear entre 100 e 2.000 µM de Trolox 2mM (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) Os resultados eram expressos em equivalentes µM de Trolox (TE/g).

4.1.3.4. Capacidade de absorção do radical Oxigênio- ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (adaptado de Prior *et, al.* (70)).

Preparou-se soluções de tampão fosfato de Potássio 75mM pH 7,4; A solução estoque de fluoresceína sódica (Estoque 1) era preparada com 3,8mg em 1mL de tampão de fosfato de potássio; A segunda solução estoque (Estoque 2) era preparada diluindo 10µL da solução estoque 1 com 990µL de tampão; e a terceira solução de fluoresceína era preparada apenas no momento do uso adicionando 160µL da solução estoque 2 e 15.840mL de tampão. Para a determinação da curva padrão era utilizada a solução de Trolox (1500µM) nas concentrações de 700 a 10µM de trolox equivalente em tampão de fosfato. O preparo do radical (2,2'-azobis (2-amidino-propano), di-hidrocloreto) (AAPH) era realizado no momento do uso, pesando-se

648mg para 6mL. Em placa para leitor de ELISA era colocado em cada poço 60µL de AAPH + 120µL de fluoresceína (terceira solução) + 20µL do extrato. A leitura da placa era feita a 37°C com excitação de 485/20 e emissão de 528/20 em cinética de 80 minutos. Os resultados eram expressos em µM trolox equivalente/g amostra.

4.1.4. Fenóis Totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes na amostra era realizada no extrato aquoso, etanol e metanol-acetona. Adicionou-se 150µL do extrato, 2.400µL de água destilada e 150µL do reagente Folin – Ciocalteu, em seguida era homogeneizado. Acrescentou-se 300µL de solução carbonato de sódio 1N (Na_2CO_3), homogeneizado e incubado por 2 horas em temperatura ambiente/escuro. A curva padrão de fenóis totais era feita pela diluição do ácido gálico (mg/mL) nas concentrações de 0,1 a 0,016 mg/mL. A quantificação era realizada em espectrofotômetro a 725nm e os resultados eram expressos em equivalentes de ácido gálico - $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ (EAG/mg/g amostra) (71).

4.1.5. Determinação da Composição Centesimal da folha de pitanga (*Eugenia uniflora*)

A composição centesimal da folha de *E. uniflora* era determinada por meio da quantificação do teor proteico, teor de lipídeos totais, cinzas (minerais totais) / umidade e o teor de carboidratos.

Para determinar a quantidade de proteína na amostra utilizou-se a técnica Kjeldahl (72). Pesou-se 1g de folha seca em 4mL ácido sulfúrico e 1,5g de mistura catalisadora (Na_2SO_4

e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) onde era digerida em bloco digestor a 350°C . Após a digestão, o material era destilado com 20mL de hidróxido de sódio 50% (NaOH) e misturado a uma solução contendo 15mL de ácido bórico (H_3BO_3) e 3 gotas do indicador de Andersen (50mL de 0,2% azul de metileno em álcool etílico+ 25mL de 0,2% vermelho de metila em álcool etílico) até a destilação atingir 100mL. O produto da destilação era então titulado em solução ácido clorídrico 0,02N (HCl). Analisando o teor de nitrogênio total identificamos a porcentagem de proteína bruta presente na amostra, através do cálculo:

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{N(HCl)} \times 0,014 \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

A porcentagem de lipídeos nas folhas era determinada pelo método Bligh & Dyer (73) pesando-se 3g de folha seca, adicionando 10mL de clorofórmio, 20mL de metanol e 8mL de água destilada. Essa mistura era mantida em agitador rotativo por 30 minutos. Adicionou-se 10mL de clorofórmio (CHCl_3) e 10mL de solução de sulfato de sódio 1,5% (Na_2SO_4) agitando por 2 minutos. A camada superior dessa solução era descartada e a inferior filtrada em papel filtro. 5mL do filtrado era transferido para um Becker tarado e levado a estufa a 100°C para evaporar o solvente e pesado quando frio. A porcentagem de lipídeo era calcula seguindo a fórmula:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{\text{peso dos lipídeos} \times \text{fator de diluição} \times 100}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

A umidade era mensurada pela remoção da água livre em 1g de amostra da folha com auxílio de estufa a 105°C overnight. O conteúdo de cinzas (sólidos totais) era determinado pela

carbonização de 1g de folha seguindo de ± 3 horas na mufla a 550°C ou até sua completa incineração (74).

A porcentagem de umidade e cinzas era calculada seguindo as fórmulas:

$$\% \text{ Sólidos totais} = \frac{\text{g do resíduo}}{\text{g amostra}} \times 100$$

$$\% \text{ Umidade} = 100 - \% \text{ sólidos totais}$$

g amostra

O teor de carboidrato é expresso subtraindo 100% da soma dos resultados anteriores.

4.1.6. Fibra Bruta

Para análise de fibra bruta, utilizava-se 1g da amostra (folha da pitanga) com 150mL de ácido sulfúrico 1,25% (H_2SO_4), durante 30 min a 100° C. Após esse tempo, o material era filtrado em tela de malha 200 mesh e ao resíduo adicionava-se 150mL de hidróxido de sódio 1,25% (NaOH). As amostras eram submetidas novamente ao processo descrito acima por 30 min a 100° C, filtrado em papel filtro Whatman com peso conhecido. O resíduo contido no papel filtro era lavado com álcool etílico a 96° GL, transferido para um cadinho com peso conhecido e levado à estufa a 105°C por 3 horas. O peso do cadinho era verificado após seu resfriamento. Após a secagem em estufa os cadinhos eram levados a mufla a 550°C para incinerar por 2 horas e seu peso era verificado após resfriamento (74). A porcentagem de fibra bruta foi calculada seguindo a fórmula:

$$\frac{\%FB = (A-C)-B \times 100}{P}$$

Onde:

A= peso conjunto (cadinho + resíduo + papel seco) (g)

B= peso conjunto (cadinho + cinzas) (g)

C= papel filtro peso (g)

P= peso da amostra (g)

4.1.7. Identificação de Taninos

4.1.7.1. Método Qualitativo

Inicialmente eram preparadas diluições de cada extrato bruto a partir das concentrações iniciais de 0,04 mg/mL (diluições: 1/5, 1/10, 1/50 e 1/100). Em um tubo de ensaio eram adicionados 2mL de cada extrato/diluição, acrescentados de 5mL de água destilada e 100μL de solução aquosa de cloreto férrico a 2%. Observou-se a formação e a coloração do precipitado, onde precipitado de coloração verde indica a presença de taninos condensados e precipitado de cor azul indicam taninos hidrolisáveis (75).

4.1.7.2. Método Quantitativo para taninos hidrolisáveis

A quantificação dos taninos hidrolisáveis foi determinada empregando o reagente

férrico de amônio, chamado de FAS-reagente, de acordo com Brune *et, al.* (1992) (76) com modificações de Shons *et, al.* (2011) (77). A curva padrão era realizada com ácido tânico (SIGMA) nas concentrações de 0,01 – 0,4mg/mL. Diluiu-se as amostras de cada extrato bruto com concentração inicial de 0,04 mg/mL, nas seguintes diluições (1/10, 1/30 e 1/10). Após a diluição era adicionado 0,2mL de cada ponto da curva/diluição de amostra aos tubos de ensaio e 0,8mL de FAS-reagente (89% tampão acetato 0,1M em pH 4,4; 10% solução de goma arábica a 1%; 1% da solução de sulfato férrico de amônio 5% preparado em HCl 1M. Após o preparo no tubo de ensaio, eram transferidas para a placa de 96 poços e era aguardado 15 minutos de reação e então era medida a absorbância a 578nm. Os resultados eram expressos em equivalente de ácido tânico (mg de AG.100g⁻¹) de amostra.

4.1.8 Análise Cromatográfica (HPLC)

Os extratos eram diluídos em metanol 80% e para validação era utilizado metodologia com padrão externo proveniente do Laboratório de Análises de Alimentos, FEA-UNICAMP, sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Prado. A identificação complementar dos possíveis antioxidante majoritários fenólicos: ácido gálico, ácido vanílico, ácido elágico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, campferol, resveratrol, quercetina, catequina, epicatequina e rutina era realizada utilizando solução estoque dos padrões (10mg mL⁻¹, grau HPLC) para a obtenção de uma curva analítica com 5 pontos variando de 2 a 16µg mL⁻¹. Os extratos eram filtrados em membrana de 0.45µm Chromafil® Xtra RC 45/25 (MACHEREY-NAGEL), antes da injeção de 20.0µL em sistema HPLC–UV/DAD (Agilent 1100, series G1315B) com fluxo de vazão 0,70 mL min⁻¹, com controle de temperatura da coluna em 30°C. A quantificação dos

compostos fenólicos era determinada com base na análise de três cromatogramas obtidos de $\lambda 210$ à $\lambda 350$ nm. A coluna cromatográfica utilizada na análise era fase reversa Eclipse XBB-C18 (Agilent Technology, EUA) onde a fase móvel constituiu-se em ácido orto-fosfórico a 1% em água ultrapura (A) e Acetonitrila 100% (B). O gradiente de eluição está apresentado na Tabela 1, pág.27.

Tempo (min)	% Fase A	% Fase B	Vazão (mL/min)
0,00	95	5	0,70
0,01	95	5	0,70
5,00	95	5	0,70
5,01	95	5	0,70
10,00	75	25	0,70
10,01	75	25	0,70
18,00	75	25	0,70
18,01	75	25	0,70
25,00	60	40	0,70
30,00	95	5	0,70
35,00	95	5	0,70

Tabela 1: Gradiente de eluição das fases móveis A e B na análise de cromatografia.

4.2. Ensaios biológicos: camundongos NOD tratados com as folhas de *E. uniflora*

4.2.1. Animais

Os camundongos fêmeas da linhagem NOD utilizados neste estudo eram provenientes do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida no Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) desde 1994.

Os procedimentos envolvendo animais e seus cuidados eram conduzidos de acordo com as diretrizes e recomendações estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) protocolo 2824-1 (ANEXO II, pág. 94).

Todos os animais eram tratados a partir da 4ª semana até a 26ª semana de vida, o peso corpóreo e a glicemia eram monitorados semanalmente a partir da 10ª semana de vida através de tiras de medição de glicemia (Medisense Optium®, Abbott Diabetes Care Inc. Alameda EUA), retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal após 4 horas de jejum. Os animais eram considerados diabéticos após leituras por dois dias consecutivos com valores de glicemia superiores a 250 mg/dL.

4.2.2. Grupos Experimentais

O grupo experimental era composto por 95 camundongos fêmeas mantidas em condições SPF, com controle de luz, temperatura e umidade no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE). Os grupos experimentais eram estabelecidos como descrito a seguir:

1) 57 camundongos NOD fêmeas 4-26 semanas, divididos em:

Grupo Extrato Aquoso: 27 camundongos NOD fêmeas tratadas com ração industrial autoclavada (LABINA-PURINA®) e ingestão diária *ad libitum* de extrato aquoso da folha da pitanga. A partir de ensaios prévios da atividade antioxidante e controle microbiológico, estabelecemos que as trocas de extrato aquoso oferecido aos animais eram a cada 2 dias. O consumo de extrato e água era mensurado a cada troca.

Era colocado 0,06g de folha de pitanga/100mL de água filtrada para processo de extração de compostos fenólicos em autoclave, 120°C por 20 minutos, seguidos por 15 minutos para resfriamento. O extrato era filtrado em sistema de filtração à vácuo em vidro (Millipore®) com membrana de 0,22µm em capela de fluxo laminar em condições estéreis. A concentração era estabelecida pela determinação IC₅₀ (concentração inicial) por meio do método de atividade antioxidante DPPH (66, 78). A cada nova coleta de folhas, a técnica de DPPH era realizada para determinação da concentração a ser utilizada.

Grupo Controle: 30 camundongos fêmeas NOD tratadas com ração industrial (LABINA-PURINA®) e ingestão hídrica *ad libitum*.

2) 38 camundongos de 15-28 semanas de vida para teste de tolerância à glicose, sendo:

- 10 camundongos NOD *E. uniflora* não diabéticos
- 10 camundongos NOD controle não diabéticos
- 8 camundongos NOD diabéticos
- 10 camundongos BALB/c

4.2.3. Controle Biológico do Extrato Aquoso de *E. uniflora*

O controle biológico do extrato aquoso era feito antes de ser oferecido para os camundongos e após o seu consumo. As placas contendo meio de cultura Sabouraud eram feitas pesando-se 65g Difco Sabouraud Dextrose Agar em 1 litro de água destilada mantendo sob agitação até completa diluição. A mistura era autoclavada por 15 minutos a 121°C e após o resfriamento eram colocados em placa de Petri estéril. A inoculação do extrato aquoso era feita em capela de fluxo laminar para evitar contaminação do meio. Eram utilizadas placas com meio Sabouraud e meio Agar Sangue para verificação de fungos e bactérias presentes no extrato aquoso. Em nenhuma análise apresentou contaminação desse extrato.

4.2.4. Diagnóstico do Diabetes e Sacrifício dos Animais

Os animais que apresentaram diabetes (glicemia superior a 250mg/dL) ou ao completarem 26 semanas eram sacrificados sendo anestesiados com cloridrato de Ketamina (100-200 mg/Kg) e cloridrato de Xilasina (5-16mg/Kg) e submetidos à coleta de sangue periférico por meio de punção cardíaca para a separação de soro no qual era utilizado para dosar a insulina por meio da técnica de ELISA.

Após esse procedimento, realizava-se a remoção do pâncreas onde eram conservados em cápsulas contendo o meio de inclusão (Tissue Tek® Miles – EUA) sendo congelados em nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer à -80 °C. Estes pâncreas obtidos eram submetidos posteriormente à criocortes (Criostato – Leica, CM 1850) para a análise histológica e imunofluorescência. O fígado e o rim desses animais também eram retirados e armazenados

em tubos plásticos de 2,0mL (livre de RNase) contendo 1mL de Ácido Tricloroacético (TCA) 5%, politronado e congelados em biofreezer à -80°C, para análise de glutathiona reduzida.

Definição e nomenclatura dos grupos após o sacrifício dos animais:

- 1) **Camundongos NOD controle:** animais não tratados que atingiram a 26ª semana, onde não tornaram-se diabéticos;
- 2) **Camundongos NOD *E. uniflora*:** animais tratados com extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* que atingiram a 26ª semana sem tornarem-se diabéticos;
- 3) **Camundongos NOD diabéticos:** animais que tornaram-se diabéticos, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, até a 26ª semana de vida.
- 4) **Camundongos BALB/c:** camundongos que não desenvolvem o diabetes, utilizados como controle de reação na metodologia de teste de tolerância à glicose.

Os grupos experimentais eram divididos em NOD controle, NOD diabético e NOD *E. uniflora* para análise de todos os resultados. Os animais diabéticos que consumiam tanto o extrato aquoso quanto água eram definidos no grupo diabético.

4.2.5. Cortes histológicos do Pâncreas

A avaliação histológica do pâncreas era realizada para análise da morfologia das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite. Coletava-se série de 15 cortes consecutivos, com 5µm de espessura, depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane, Sigma). Após a obtenção da primeira série de cortes, o

pâncreas era desbastado 150µm e a seguir outra série de 15 cortes era realizada. As lâminas nº: 1, 15, 16, 30, 31 e 45 eram coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE) e observadas em microscópio óptico Eclipse 80i® (Nikon) e as lâminas subsequentes eram utilizadas para técnica de imunofluorescência indireta.

4.2.6. Coloração HE (Hematoxilina e Eosina)

As lâminas nº: 1, 15, 16, 30, 31 e 45 de cada animal eram mantidas por 15 minutos na acetona gelada. Após esse tempo os cortes eram colocados na hematoxilina por 30 segundos e lavados em água corrente, posteriormente colocados durante 45 segundos na eosina, seguido de água corrente para retirada do excesso do corante. Em seguida 4 lavagens em álcool 99,5% eram feitas para eliminar o excesso de água. Durante 3 minutos as lâminas eram mantidas em xilol I (xilol 100%) e 5 minutos xilol II (100%), e posteriormente eram montadas com meio Entellan (Merk® KGaA, Darmstadt, Germany) para observação no microscópio óptico Eclipse 80i® (Nikon).

4.2.7. Avaliação Histológica do Pâncreas

Os cortes depois de corados pelo HE eram submetidos a contagem de ilhotas pancreáticas e classificadas segundo o grau de infiltrado celular (insulite) em microscópio óptico Eclipse 80i® (Nikon). A classificação das ilhotas analisadas era realizada segundo os critérios estabelecidos por Signori *et al.* (1989) (79) com adaptações feitas em nosso laboratório (11).

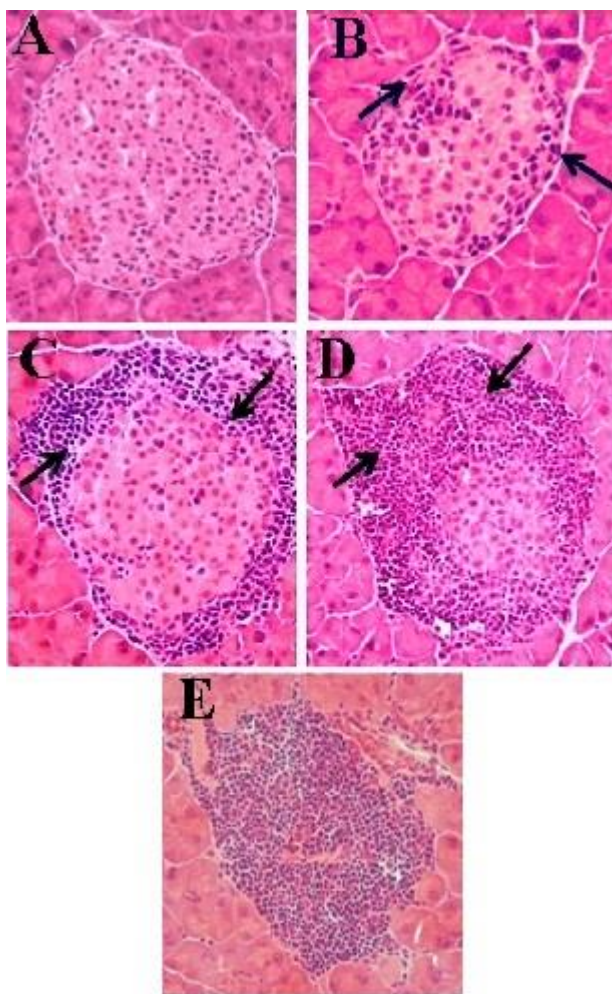
As ilhotas eram contadas e classificadas por grau, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referentes ao número de ilhotas de cada grau/total contadas por animal, para cada grupo experimental e calculado o índice de infiltrado celular, segundo a fórmula (80):

$$I = \frac{(0 \times N0) + (1 \times N1) + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{4 \times (N0 + N1 + N2 + N3 + N4)}$$

Onde os números 0, 1, 2, 3 e 4 representam os diferentes graus de insulite (como descrito anteriormente); N0, N1, N2, N3 e N4 representam o número total de ilhotas com seus respectivos graus de infiltração e o I (índice) a destruição total da ilhota. As lâminas subsequentes da coloração de HE eram utilizadas para técnica de imunofluorescência indireta.

Segundo protocolo estabelecido em nosso laboratório, o grau 0 é constatado quando a ilhota não apresenta infiltrado celular. Ilhotas de grau 1 apresentam infiltrado inferior a 25%. Quando a ilhota possui infiltrado entre 25 e 80% de sua área, ela é classificada como de grau 2. O grau 3 apresenta ilhotas com infiltrado superior a 80% e inferior a 100%, enquanto ilhotas com sua área completamente tomada pelo infiltrado celular são classificadas como ilhotas de grau 4 (Prancha 1, pág.34).

- A) 0 = normal, ausência de infiltrado;
- B) 1 = Peri-insulite, presença de <25% de infiltrado ao redor da ilhota;
- C) 2 = insulite moderada, 25-80% da ilhota invadida pelo infiltrado;
- D) 3 = insulite invasiva, >80% da ilhota invadida;
- E) 4 = insulite destrutiva, invasão total da ilhota pelo infiltrado.



Prancha I: Imagem representativa de ilhotas pancreáticas de camundongos NOD em diferentes graus de infiltração celular. A) Grau 0 (0%); B) Grau 1 (< 25%); C) Grau 2 (25 - 80%); D) Grau 3 (> 80%); E) Grau 4 (100%).

4.2.8. Teste de Tolerância à Glicose

O procedimento seguia o protocolo estabelecido por Andrikopoulos *et al.* (2008) (81). Camundongos com 15-28 semanas de vida, dividido nos seguintes grupos: camundongos NOD tratados com o extrato aquoso de *E. uniflora* (n=10), controles (n=10), diabéticos (n=8) e camundongos BALB/c (n=10).

Os animais eram mantidos em jejum durante 4 horas seguido da dosagem glicêmica no tempo 0, retirando-se amostra de sangue da veia caudal e dosada através de tiras de medição de glicemia (Medisense Optium[®], Abbott Diabetes Care Inc. Alameda, EUA). Logo após a dosagem no tempo 0, procedia-se a administração via intraperitoneal de glicose 25% (1g/Kg/peso), e leitura das demais glicemias nos tempos 10, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose.

4.2.9. Detecção dos níveis de insulina sérica

A análise de insulina sérica seguiu o protocolo do ELISA Kit rat/mouse Insulin descrito pelo fabricante (Millipore[®], Billerica, EUA). Após jejum de 4 horas, os camundongos eram sacrificados e retirado o sangue total para posterior separação do soro para dosagem. Sua leitura era feita nos comprimentos de onda 450nm e 590nm em espectrofotômetro (Spectramax, 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) e sua curva lida em 4 parâmetros.

4.2.10. Análise de Proteína – Hartree

A análise de proteína seguiu Hartree (82) com algumas modificações. As amostras de fígado e rim mantidas em TCA 5% eram diluídas 5 vezes em água e era adicionado 900µL de solução A (1g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + 50g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 250 mL NaOH 1N + 500mL H_2O), levada ao banho-maria a 50°C por 10 minutos. Na sequência adicionou-se 100µL de solução B (2g NaK+ 1g CuSO_4 + 90mL H_2O + 10mL NaOH 1N) e manteve em temperatura ambiente por mais 10 minutos. Após esse tempo 3mL da solução C (10mL Folin Ceacalteau + 150mL H_2O) era adicionada rapidamente, deixando em banho-maria 50°C por mais 10 minutos. A leitura era feita em espectrofotômetro a 650nm. O valor encontrado de proteína era utilizado para calcular a quantidade de glutatona presente nas amostras de fígado e rim.

4.2.11. Análise GSH- Glutathiona Reduzida

As amostras de fígado e de rim eram descongeladas em temperatura de 2°C e centrifugadas a 4°C, 68 x g., por 15 minutos em centrífuga Jouan MR23i®. O sobrenadante era coletado e mantido sobre gelo até o uso. Em uma placa para leitor de ELISA colocou 100µL de tampão tris /EDTA (12 mg Tris+100mL água, pH 8,2 / 37,5 mg EDTA +5mL água- misturar 100µL de EDTA na solução de Tris), 100µL da curva de GSH (nas concentrações 2.5 a 500) e 100µL das amostras de fígado e rim. Sua primeira leitura era feita a 412nm em espectrofotômetro. Após essa leitura, 20µL de Reativo DTNB ((ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) - 10mM), (20mg DTNB + 5mL de Metanol) era aplicado em cada poço da placa. A placa era mantida no escuro, em temperatura ambiente por 15 minutos e após esse

período era feita a segunda leitura a 412nm. O cálculo da glutathione era efetuado dividindo o valor total de proteína, estabelecido pela técnica de Hartree, pelo valor de glutathione encontrado nas amostras de fígado e rim. O resultado de glutathione era expresso em g/proteína (83).

4.2.12. Dosagem das enzimas hepáticas ALT e AST

Os parâmetros bioquímicos, como enzimas séricas hepáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) eram dosadas nos soros dos camundongos NOD e BALB/c por meio do kit Labteste ALT (ref 108) e AST (ref 109). O sistema ALT e AST Liquiform utiliza medições em modo cinético e sua quantificação era realizada em analisador automático (Labmax 240 - Labtest®) capazes de medir absorbância em 340nm.

4.2.13. Imunofenotipificação de células da ilhota

Para a técnica de fenotipificação utilizou-se anticorpos primários nas seguintes diluições: anti-insulina (1:100), anti-somatostatina (1:100), anti-glucagon (1:150), anti-GLP-1 (1:100), (Santa Cruz, Ca, EUA). Os anticorpos secundários conjugados com fluorocromo empregados: fluoresceína isotiocianato (FITC) e texas red (TR): goat anti-rabbit (1:1000) para glucagon, somatostatina, insulina, (Vector Laboratories - Burlingame, CA, EUA). Para os bloqueios eram utilizados isotipos da espécie de onde proveio o anticorpo secundário (Vector). O microscópio Eclipse 80i® (Nikon) era empregado para análise, e as imagens capturadas e processadas em Tempo Real pelo programa computacional NIS-ELEMENTS AR®, (Nikon).

Para a quantificação das células marcadas nas ilhotas era empregado o programa computacional de uso livre ImageJ®/Fiji versão 1.64 (Instituto Nacional de Saúde, EUA).

As lâminas selecionadas eram colocadas na acetona por 15 minutos seguido de 3 lavagens em PBS 1M por 5 minutos. As lâminas eram mantidas em solução bloqueio por 2 horas em temperatura ambiente seguido de 3 lavagens em PBS 1M por 10 minutos e as lâminas eram incubadas com anticorpo primário a 8°C, overnight. No dia seguinte, após 3 lavagens cada em PBS 1M por 10 minutos e as lâminas eram incubadas com o anticorpo secundário por 2 horas em temperatura ambiente. Passadas as 2 horas, eram realizadas mais 3 lavagens e as lâminas eram montadas com meio de montagem (Dabco - 0,5g, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA); Glicerol - 18mL (Sigma), PBS 0,15M - 1,2mL e mantidas a 8°C.

4.3. Análise Estatística

Os resultados eram expressos como média e desvio padrão e submetidos à análise por:

- 1) Teste t *Student* para análise de consumo;
- 2) Teste estatístico ANOVA unicaudal de variância com pós-teste de Tukey e teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns para o restante das análises.

Nos gráficos, letras iguais localizadas em cima das barras correspondem à ausência de diferença estatística entre os grupos, enquanto letras diferentes correspondem a grupos estatisticamente diferentes. Eram considerados dados estatísticos significativos quando $p < 0,05$, empregando o programa computacional GraphPad versão 5.0 (San Diego, Califórnia, EUA).

4.4. Formatação do Texto

Para formatação das citações e referências bibliográficas, empregou-se o programa computacional EndNote X7 (Copyright© The Thompson Corporation.EUA) e o formato Vancouver, segundo as normas da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp.

5. RESULTADOS

5.1 Ensaio Químico e Atividades antioxidantes das folhas de *E.uniflora*

5.1.1. Atividade Antioxidante pelas técnicas DPPH, FRAP, ABTS e ORAC nos extratos Aquoso, Etanol e Metanol/Acetona

A porcentagem da atividade antioxidante (%AA) pelo método DPPH, corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo extrato. Embora não haja diferença estatística entre o extrato aquoso e o extrato etanol, o extrato aquoso apresentou maior porcentagem do sequestro do radical ($39,9 \pm 4,7$) quando comparado aos demais extratos, etanol ($34,2 \pm 3,6$) e metanol/acetona ($27,6 \pm 4,9$). Contudo observou-se na análise FRAP, resultados diferentes encontrados no DPPH, sendo que o extrato aquoso ($95,0 \pm 14,5$) apresentou atividade antioxidante mais elevada quando comparado com o metanol/acetona ($80,0 \pm 4,8$) e o etanol ($64,2 \pm 4,7$) (Fig.2 A e B, pág. 43).

A técnica ABTS mostrou resultados semelhantes à técnica FRAP, sendo o extrato aquoso com maior atividade (35792 ± 2557), seguido metanol/acetona (28960 ± 1699) e extrato etanol (24775 ± 1499). Já a técnica ORAC não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os extratos aquoso ($1118 \pm 262,6$), etanol ($1021 \pm 202,6$) e metanol/acetona ($1001 \pm 376,7$) (Fig.3 A e B, pág.44).

5.1.2. Fénóis Totais dos extratos Aquoso, Etanol e Metanol/Acetona

A análise de fenóis totais das folhas de *E. uniflora* mostrou concentração de fenóis maiores no extrato aquoso ($73,3 \pm 2,5$) que o extrato etanol ($44,8 \pm 2,0$) e extrato metanol/acetona ($64,8 \pm 2,6$) (Fig.4, pág.45).

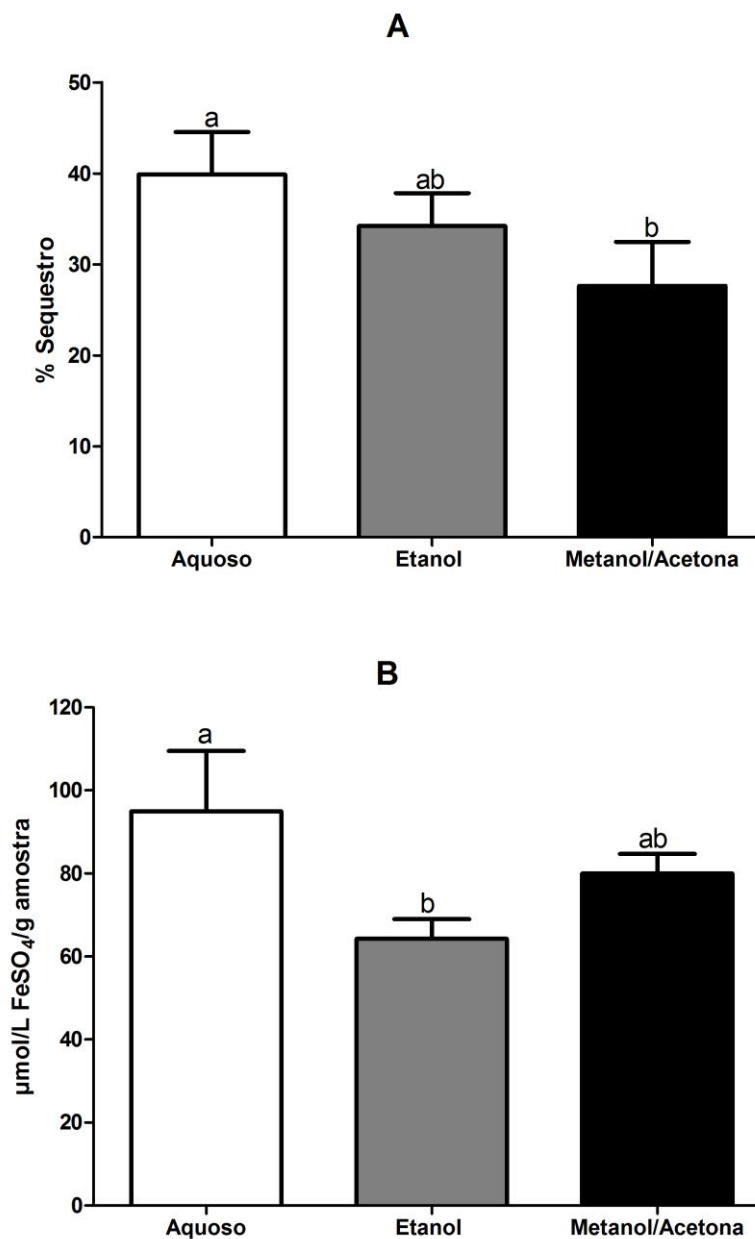


Figura 2: Porcentagem de sequestro do radical DPPH nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona (A), os resultados são expressos em porcentagem de sequestro. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$. Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona (B), os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de $\mu\text{M FeSO}_4/\text{g}$ amostra. As diferentes letras mostram diferenças estatísticas entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$.

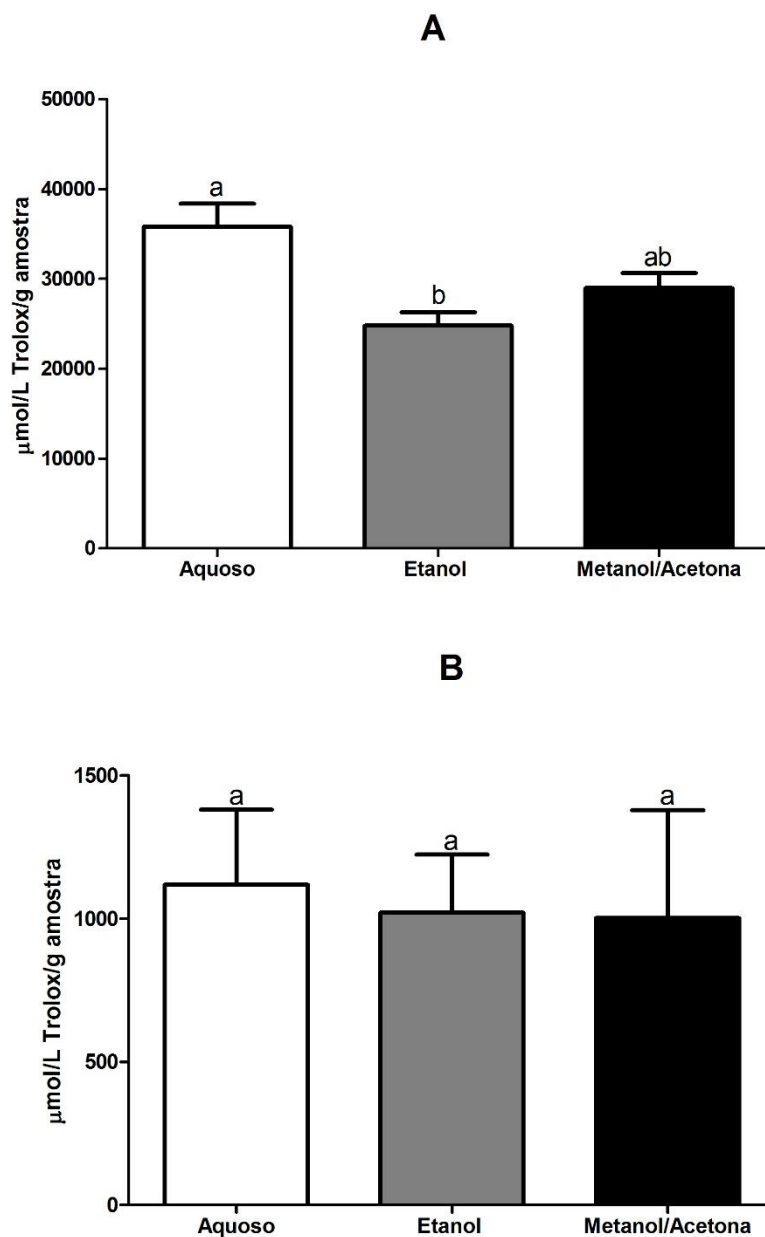


Figura 3: Análise da atividade antioxidante pelo método ABTS (A) e ORAC (B) nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona, os resultados são expressos em μM Trolox/g amostra. As diferentes letras mostram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$.

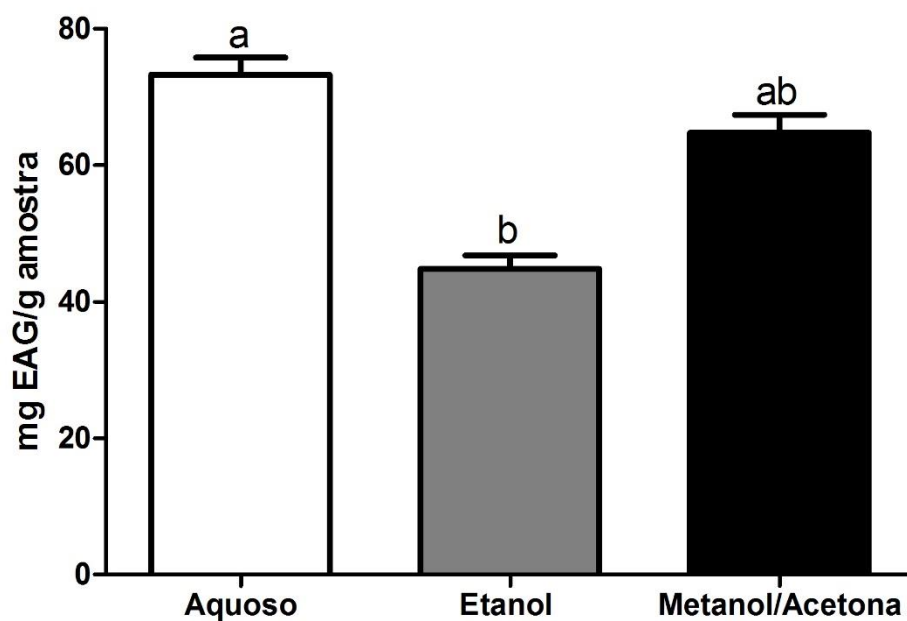


Figura 4: Fenóis totais nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de mg EAG/g amostra e as diferentes letras mostram diferenças estatísticas entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$.

5.1.3. Identificação da Composição Centesimal e Fibras das Folhas de *E.uniflora*

Na análise da composição centesimal das folhas de *E.uniflora* foi avaliado o percentual de proteínas, lipídeos, cinzas, carboidratos e fibras. Os resultados mostraram que existe concentração elevada de carboidratos e proteínas (70,38%; 11,93%), seguido do teor de fibras (16,4%), cinzas (8,13%), umidade (7,55%) e de lipídeos (4,99%) (Tabela 2, pág.47).

5.1.4. Identificação de Taninos

5.1.4.1. Método qualitativo e quantitativo para taninos hidrolisáveis

Na análise da identificação dos taninos nos 3 extratos das folhas de *E. uniflora*, verificou-se a presença de taninos hidrolisáveis pelo método qualitativo, onde observou-se a coloração azulada do precipitado, indicando uma reação positiva. (Fig. 5 e 6, pág. 48). Para a confirmação e a quantificação dos taninos hidrolisáveis presentes nos extratos, realizou-se a técnica com o método quantitativo, onde confirmou a presença desses taninos e o extrato etanol extraiu melhor esses taninos ($167,7 \pm 5,3$), mas não houve diferença estatística do extrato aquoso ($154,5 \pm 11,0$) em relação ao extrato etanol e o extrato metanol/acetona ($154,1 \pm 14,5$). (Fig.7, pág.49).

Folha de <i>E.uniflora</i>	
Carboidrato	70,38 ± 6,14
Proteína	11,93 ± 0,58
Cinzas	8,13 ± 0,38
Umidade	7,55 ± 0,26
Lipídeos	4,99 ± 0,06
Fibras brutas	16,40 ± 0,67

Tabela 2: Composição centesimal e fibras brutas da folha de *E. uniflora*. Os resultados são expressos para carboidrato, proteína, cinzas, umidade e lipídeos em um total de 100% e porcentagem de fibras com média ± desvio padrão.

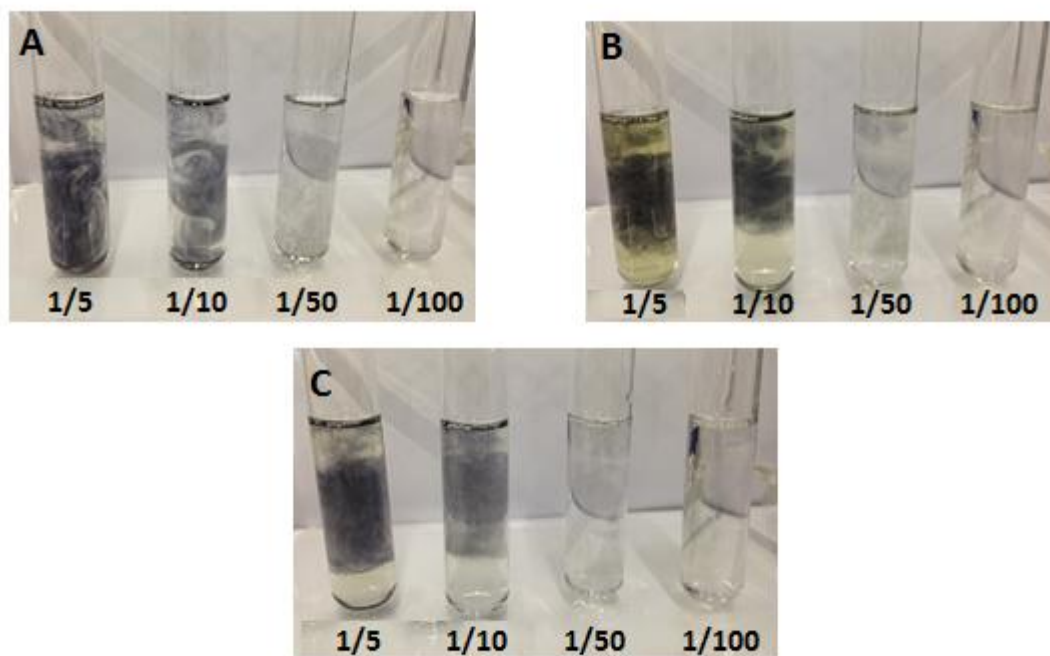


Figura 5: Detecção de Taninos hidrolisáveis nos extratos de *E. uniflora*. (A) Extrato aquoso. (B) Extrato etanol. (C) Extrato metanol/acetona. Os extratos eram preparados nas seguintes diluições (1/5, 1/10, 1/50 e 1/100; respectivamente).

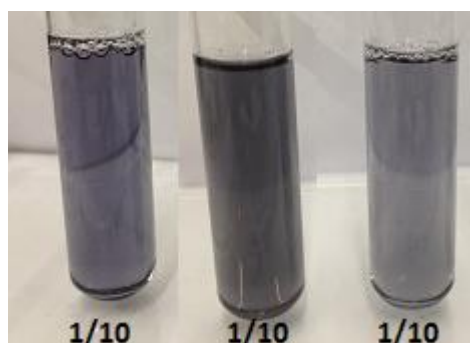


Figura 6: Comparação da presença de tanino hidrolisado entre a diluição 1/10 nos três extratos: aquoso, etanol e metanol/acetona.

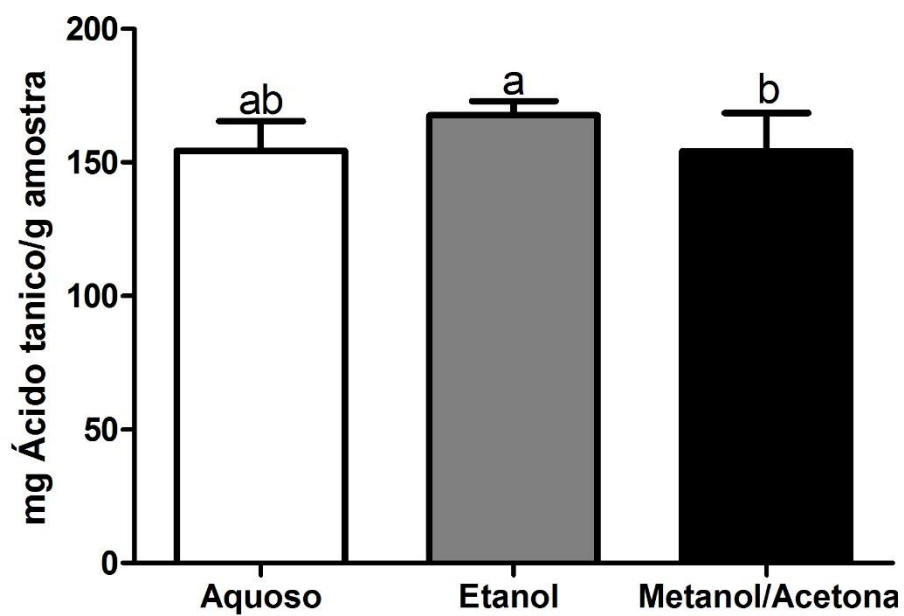


Figura 7: Quantificação dos taninos hidrolisáveis nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de mg AG/g amostra e as diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

5.1.5. Caracterização Cromatográfica (HPLC)

Após o processo de extração, as amostras foram analisadas por HPLC – DAD para a identificação de fenólicos (ácido elágico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido p-coumárico, ácido ferúlico, campferol, resveratrol, quercetina, catequina, epicatequina e rutina). A identificação foi realizada com base no tempo de retenção dos padrões em HPLC e pelo espectro obtido por meio do detector UV/DAD. Dos diversos majoritários injetados e analisados identificamos somente ácido elágico, ácido gálico e rutina nos extratos estudados. Contudo os componentes estudados não estavam caracteristicamente aumentados no extrato aquoso em comparação com os demais extratos (Fig.8, pág.52). Na (Fig.9, págs.53 e 54) representamos o cromatograma completo da corrida, o cromatograma e espectro de UV dos compostos identificados no extrato aquoso, pois foi o extrato aquoso com que trabalhamos o decorrer do trabalho.

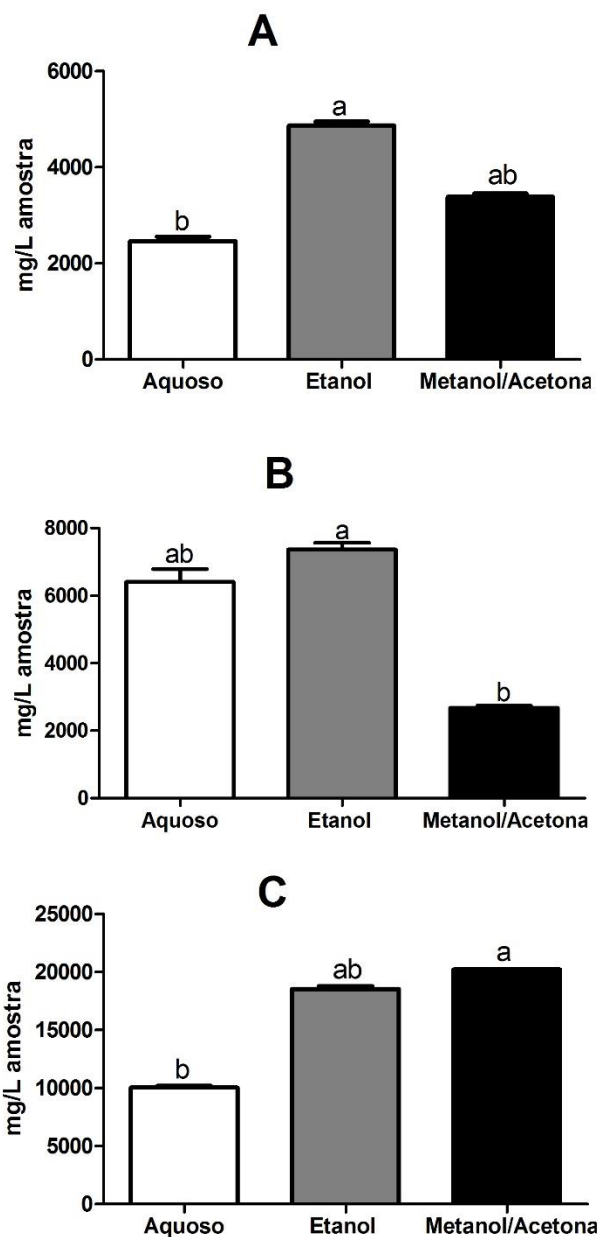
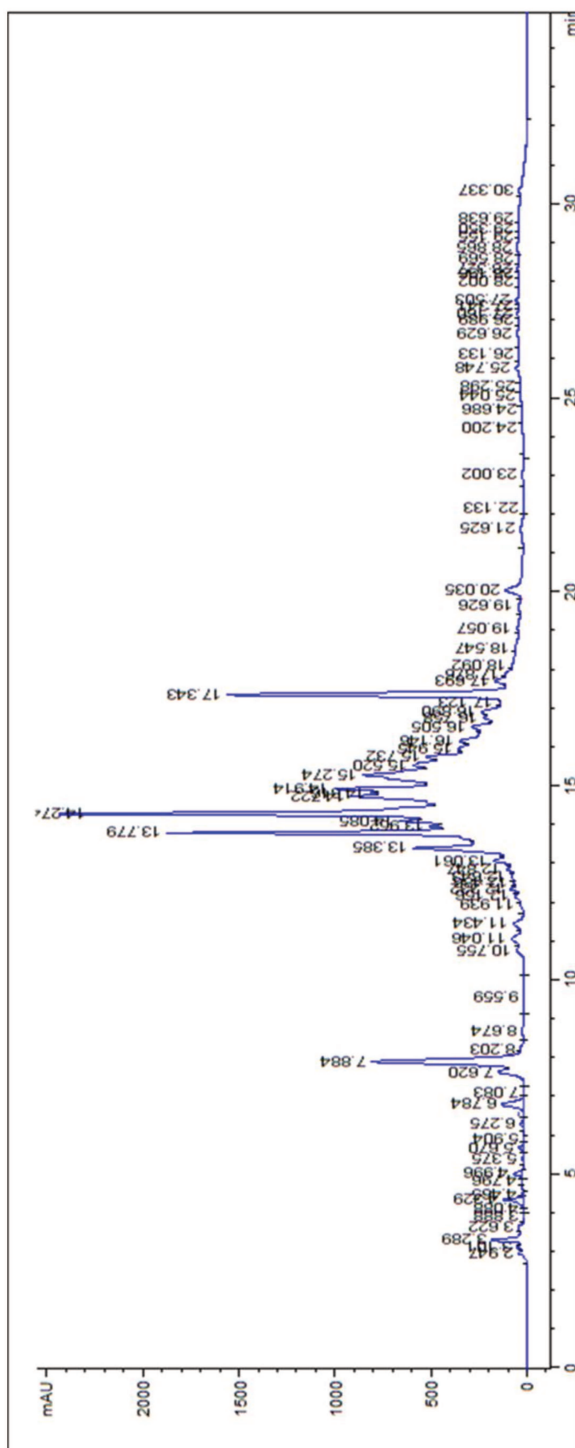
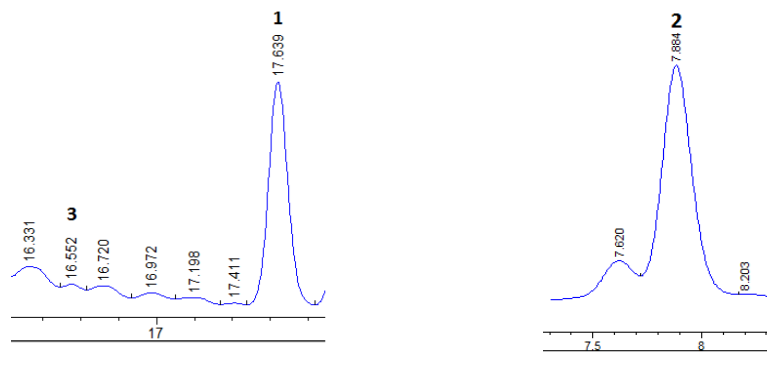


Figura 8: Quantificação dos compostos fenólicos nos extratos aquoso, etanol e metanol/acetona. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio padrão de mg/L amostra. **A:** Ácido elágico; **B:** Ácido gálico e **C:** Rutina. As diferentes letras demonstram diferença estatística entre os extratos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

A)



B)



C)

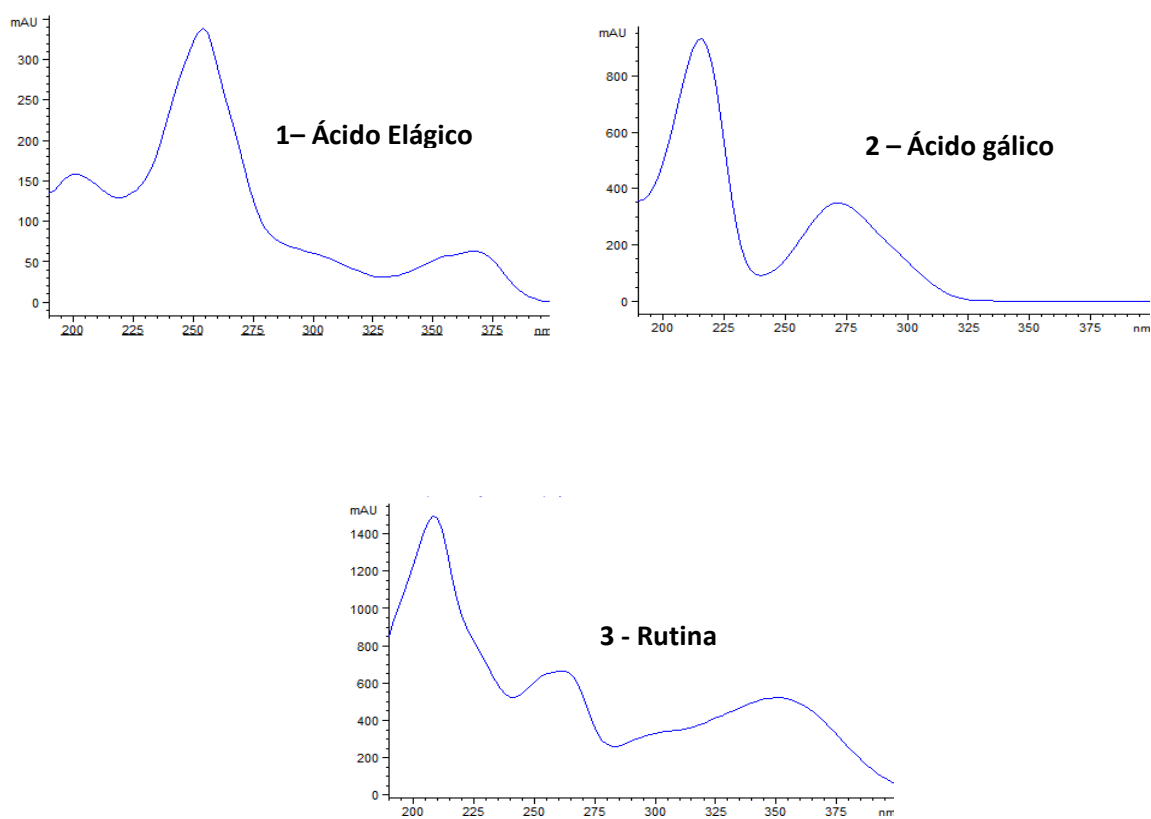


Figura 9: A) Cromatograma completo do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*; B) Cromatograma dos compostos identificados, ácido elágico (1); ácido gálico (2) e rutina (3); C) Espectro do extrato aquoso dos compostos identificados.

5.2. Ensaio biológico: camundongos NOD tratados com as folhas de *E. uniflora*

5.2.1. Consumo de água e do extrato aquoso de *E.uniflora*

Os resultados do consumo semanal de água ($33,1 \pm 5,0$ mL/animal) e extrato aquoso ($39,7 \pm 8,0$ mL/animal) não apresentaram diferença estatística significativa entre os dois grupos (Fig. 10, pág.56).

5.2.2. Efeito do tratamento com extrato Aquoso de *E.uniflora* sobre a manifestação do diabetes auto imune espontâneo

O tratamento de camundongos NOD com extrato aquoso de *E.uniflora* mostrou-se capaz de reduzir a manifestação do diabetes, visto que 40,7% dos animais tratados (11/27) desenvolveram a doença contra 60% dos animais do grupo controle (18/30) (Fig. 11, pág. 56).

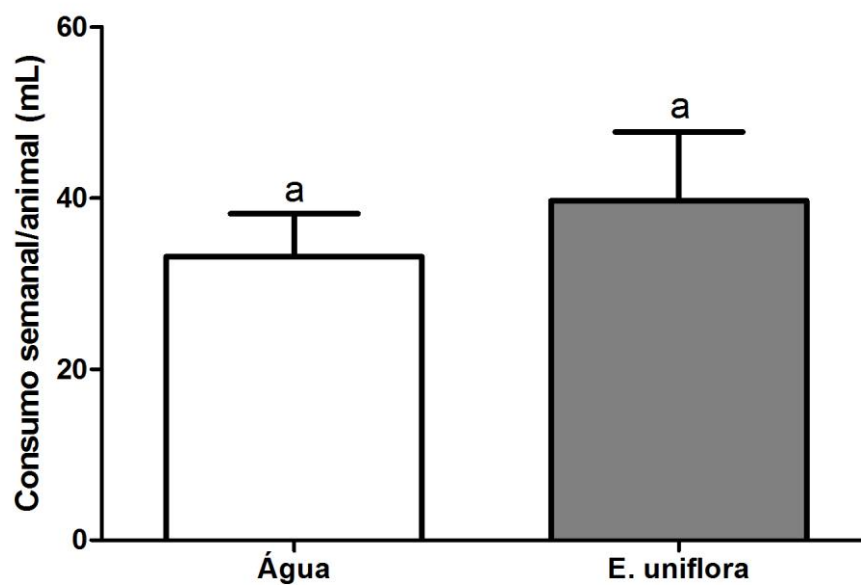


Figura 10: Consumo semanal de água e extrato aquoso dos camundongos NOD. Consumo de água 33,1±5,0 mL/animal; consumo de extrato aquoso 39,7±8,0 mL/animal. Teste estatístico *t-Student*, com marcador estatístico "a".

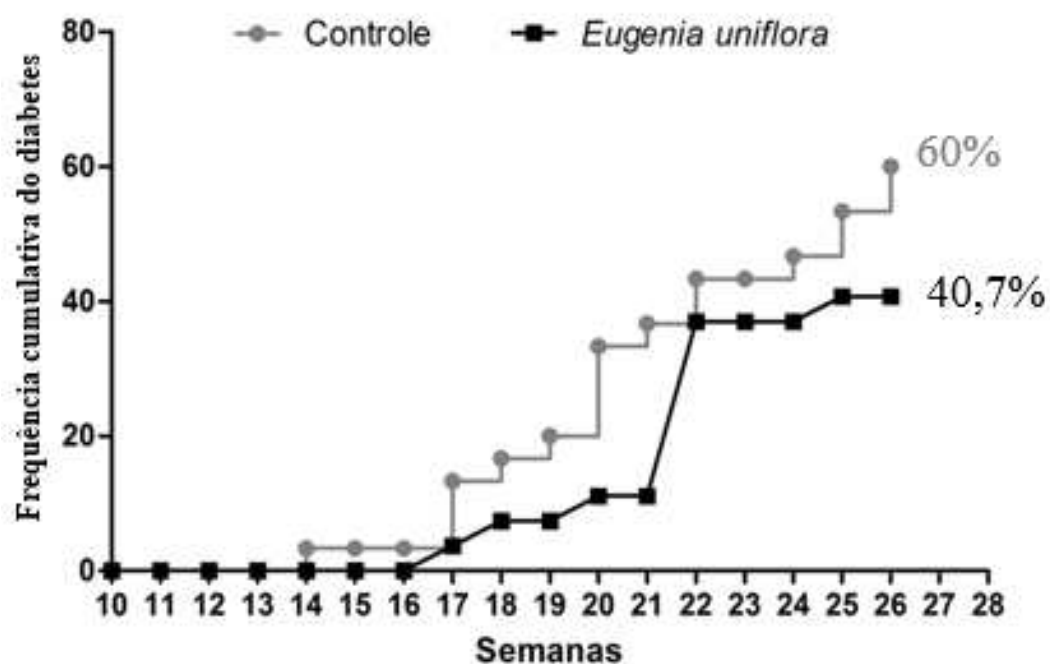


Figura 11: Frequência cumulativa da incidência do DM-1 nos camundongos NOD submetidos ao tratamento com extrato aquoso de *E. uniflora* ou controle. 60% (18/30) dos camundongos do grupo controle apresentaram diabetes, ao passo que a incidência no grupo tratado com o extrato aquoso de pitanga foi de 40,7% (11/27), apresentando diferença de 19,3% entre as frequências.

5.2.3. Efeito do tratamento com extrato aquoso *E. uniflora* sobre o processo inflamatório e índice de infiltrado nas Ilhotas Pancreáticas

A análise morfológica pela coloração de H.E, seguida pela classificação das ilhotas segundo o grau de infiltrado celular revelou que nos animais tratados com extrato aquoso de *E.uniflora* apresentou maior quantidade de ilhotas com grau I e II comparada com os animais do grupo controle e grupo diabético que apresentaram ilhotas de grau II e III. Revelou também maior número de ilhotas de grau 0 (ausência do infiltrado) no grupo tratado (n=16), seguido do grupo controle (n=4) e grupo diabético (n=1). Observamos também quantidades elevadas de ilhotas de grau IV (100% de infiltrado) no grupo controle (n=16) e diabético (n=15) quando comparado ao grupo tratado (n=5) (Fig.12, pág.58). A partir do índice de insulite, pode-se observar que os animais tratados com *E. uniflora* apresentam resultados $0,43 \pm 0,1$, nos animais controle $0,63 \pm 0,1$ e no grupo diabético $0,65 \pm 0,09$ (Fig. 13, pág.59).

5.2.4. Teste de Tolerância à Glicose em camundongos NOD e BALB/c

No teste de tolerância a glicose, vimos que a glicose sanguínea (mg/dL) em relação ao tempo (minutos) no grupo tratado com as folhas de *E. uniflora* se assemelha com o grupo BALB/c no qual são animais saudáveis. Assim, houve diferença estatística dos grupos BALB/c e *E. uniflora*, quando comparados ao grupo diabético, mas não houve diferença estatística do grupo Controle comparado aos demais grupos (Fig.14, pág.60). A partir da área sob a curva, pode-se observar que os animais BALB/c apresentam resultados 13410 ± 545.1 ; nos animais *E. uniflora* 15907 ± 1532 ; no controle 18045 ± 940 e no grupo diabético 39696 ± 6771 (Fig. 15, pág.60).

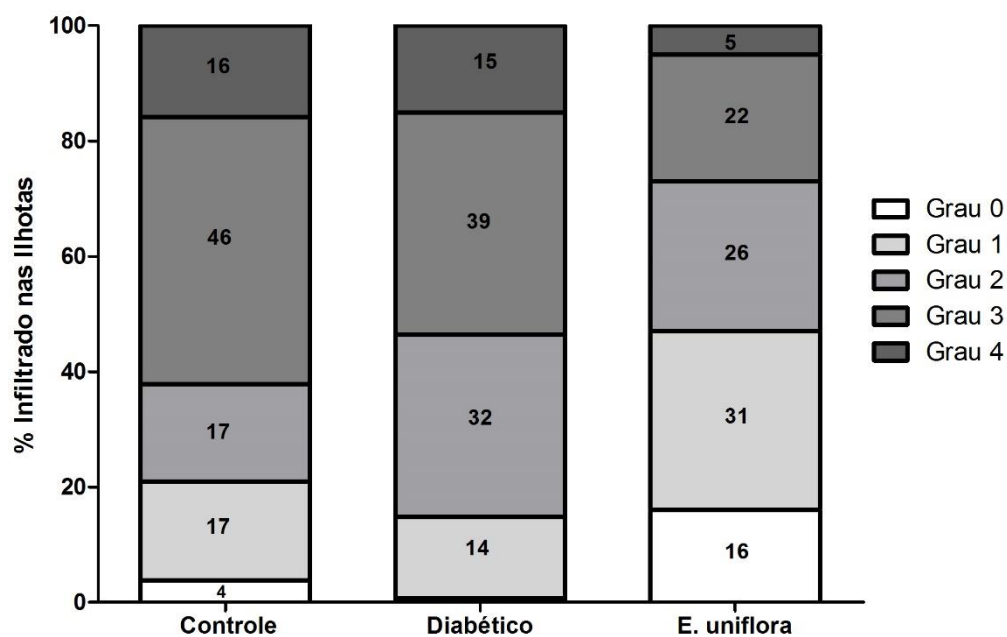


Figura 12: Gráfico representativo da classificação das ilhotas pancreáticas segundo o grau de insulite em camundongo NOD controle (n=5), NOD *E. uniflora* (n=5) e NOD diabético (n=5). Número total de ilhotas analisadas em cada grupo = 300. Cada grupo representa 100%, onde o grupo diabético apresentou apenas 1% de ilhotas do grau 0.

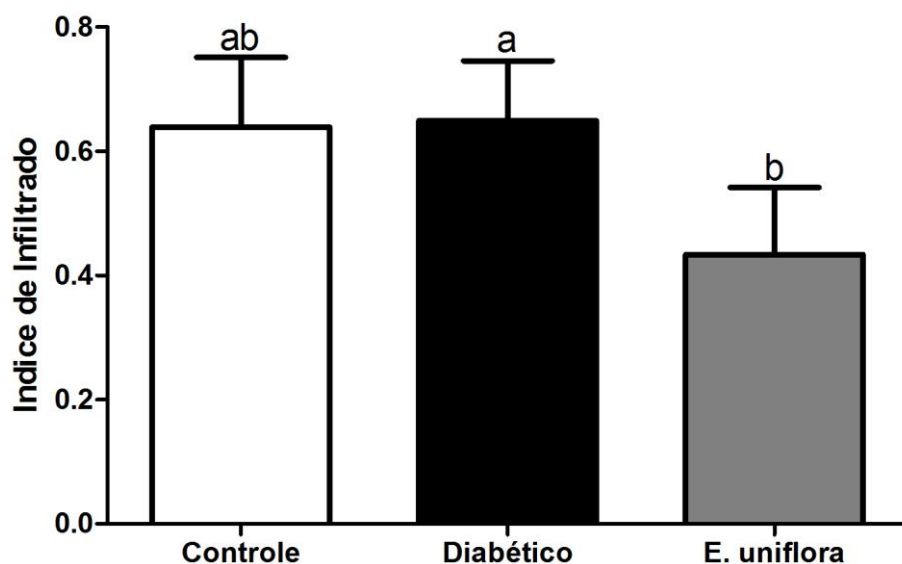


Figura 13: Gráfico representativo do Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD dos grupos controle, *E. uniflora* e diabético. Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. NOD controle (n=5); diabético (n=5); NOD *E. uniflora* (n=5). 300 ilhotas foram analisadas por grupo. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

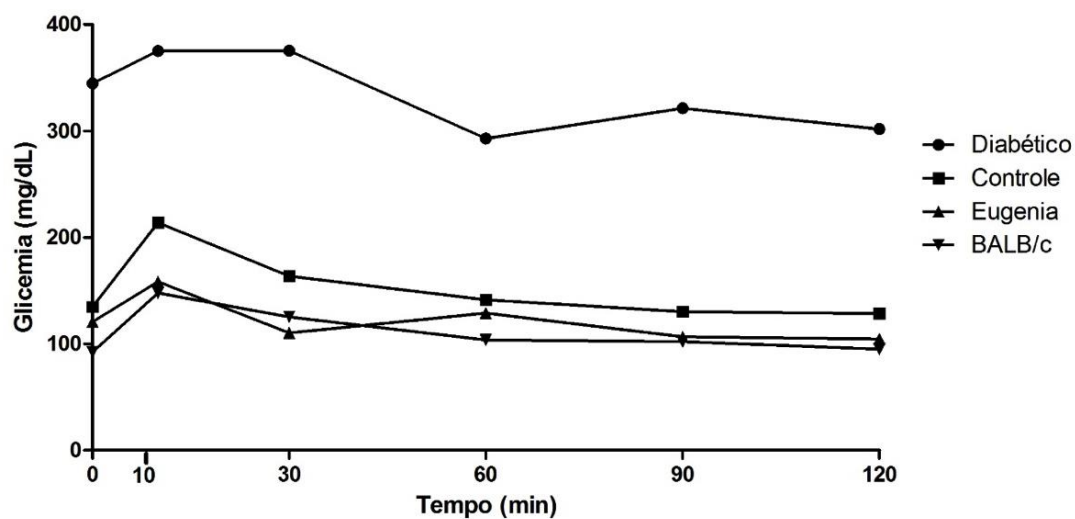


Figura 14: Glicose sanguínea (mg/dL) durante o teste de tolerância à glicose nos camundongos NOD referente aos grupos Diabético, Controle, *E. uniflora* e BALB/c.

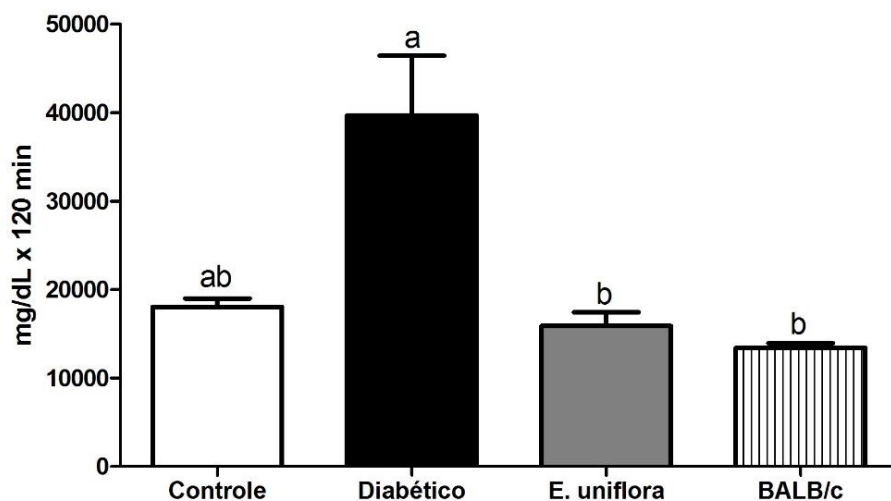


Figura 15: Área sob a curva de glicose em camundongos NOD dos grupos Diabético, Controle, *E. uniflora* e camundongos BALB/c. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

5.2.5. Efeitos do extrato Aquoso sobre a concentração de insulina sérica

Observamos diferença estatística significativa de insulina entre os animais diabéticos ($0,85 \pm 0,5 \text{ ng/mL}$) comparados ao grupo controle ($1,95 \pm 1,3 \text{ ng/mL}$) e *E. uniflora* ($2,56 \pm 2,1 \text{ ng/mL}$), não havendo diferença entre os grupos controle e *E. uniflora*, que apresentaram valores superiores na concentração sérica de insulina quando comparados aos animais diabéticos (Fig.16, pág. 63).

5.2.6 Níveis de glutathione presentes no fígado e rim dos camundongos NOD

A quantidade de glutathione era analisada no fígado e rim dos camundongos NOD fêmeas. Para exclusão de outras proteínas presentes nesses órgãos era feita a técnica de Hartree.

O fígado dos animais do grupo controle ($3992 \pm 165,4 \text{ nmol/mg}$) e dos animais tratados com o extrato de *E. uniflora* ($3926 \pm 308,1 \text{ nmol/mg}$) apresentaram quantidades de glutathione superiores ao grupo diabético ($3390 \pm 476,2 \text{ nmol/mg}$) como mostrado na (Fig.17 A, pág.64).

Já a análise de glutathione no rim dos animais de ambos os grupos não apresentaram diferença estatística (controle $1975 \pm 158 \text{ nmol/mg}$), (*E. uniflora* $1915 \pm 344,2 \text{ nmol/mg}$) e (diabéticos $1860 \pm 421,1 \text{ nmol/mg}$) (Fig.17 B, pág.64).

5.2.7 Níveis de enzimas hepáticas no soro dos camundongos NOD e BALB/c

Observamos diferença estatística das enzimas hepáticas AST e ALT apenas entre os grupos BALB/c e Diabético. Sendo os seguintes valores para ALT: controle ($18,8 \pm 12,1$ U/L), diabético ($128,6 \pm 101,2$ U/L), *E. uniflora* ($18,8,2 \pm 2,9$ U/L) e BALB/c ($12,8 \pm 3,9$ U/L). E para AST: controle ($174 \pm 103,4$ U/L), diabético ($217,9 \pm 177,8$ U/L), *E. uniflora* ($107,2 \pm 27,4$ U/L) e BALB/c ($57,4 \pm 8,4$ U/L) (Fig.18 A e B, pág. 65).

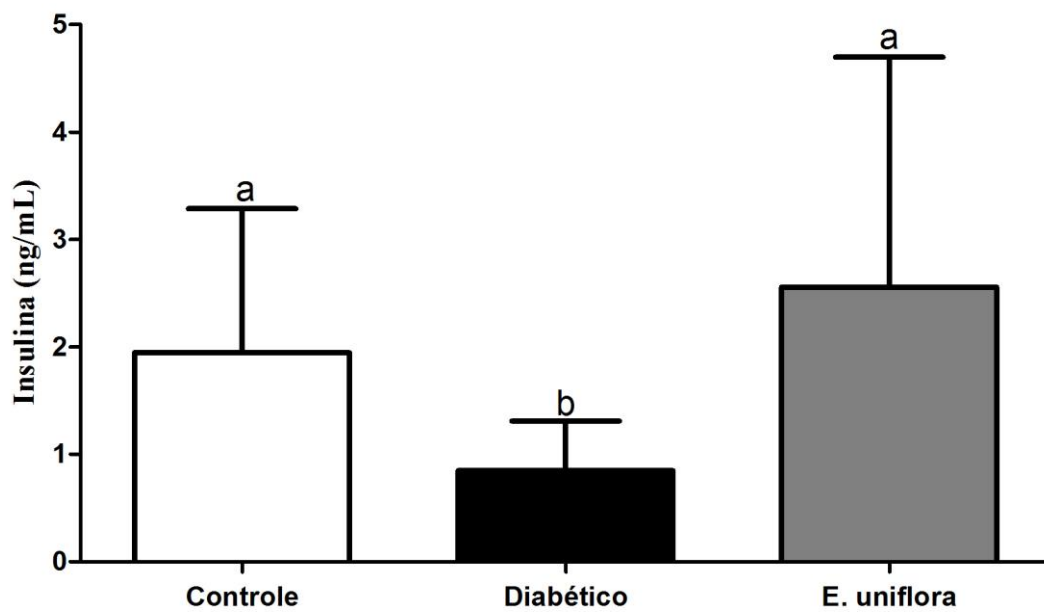


Figura 16: Concentração de insulina sérica determinada pelo método enzimático ELISA em camundongos NOD do grupo controle (n=15), diabético (n=15) e *E. uniflora* (n=15). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

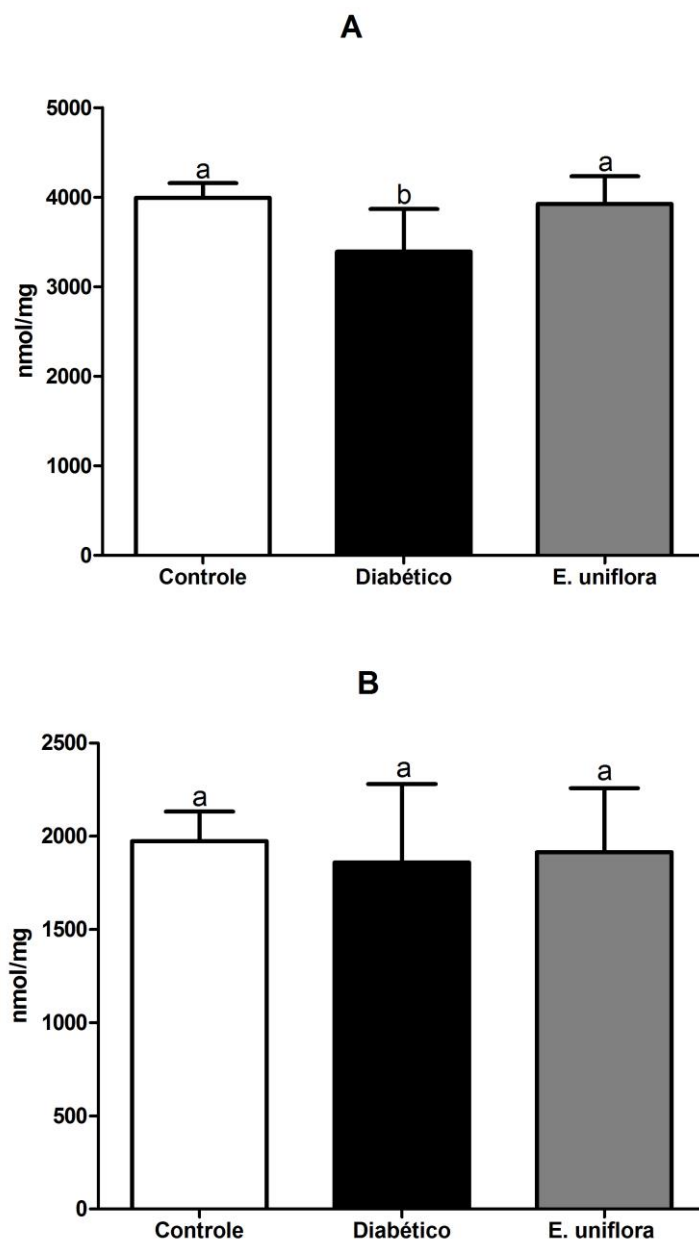


Figura 17. A) Gráfico representativo da concentração da glutathiona reduzida presente no fígado de camundongos NOD nos grupos controle, diabético e *E. uniflora*. B) Glutathiona presente no rim de camundongos NOD fêmeas do grupo controle, diabético e *E. uniflora*. Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

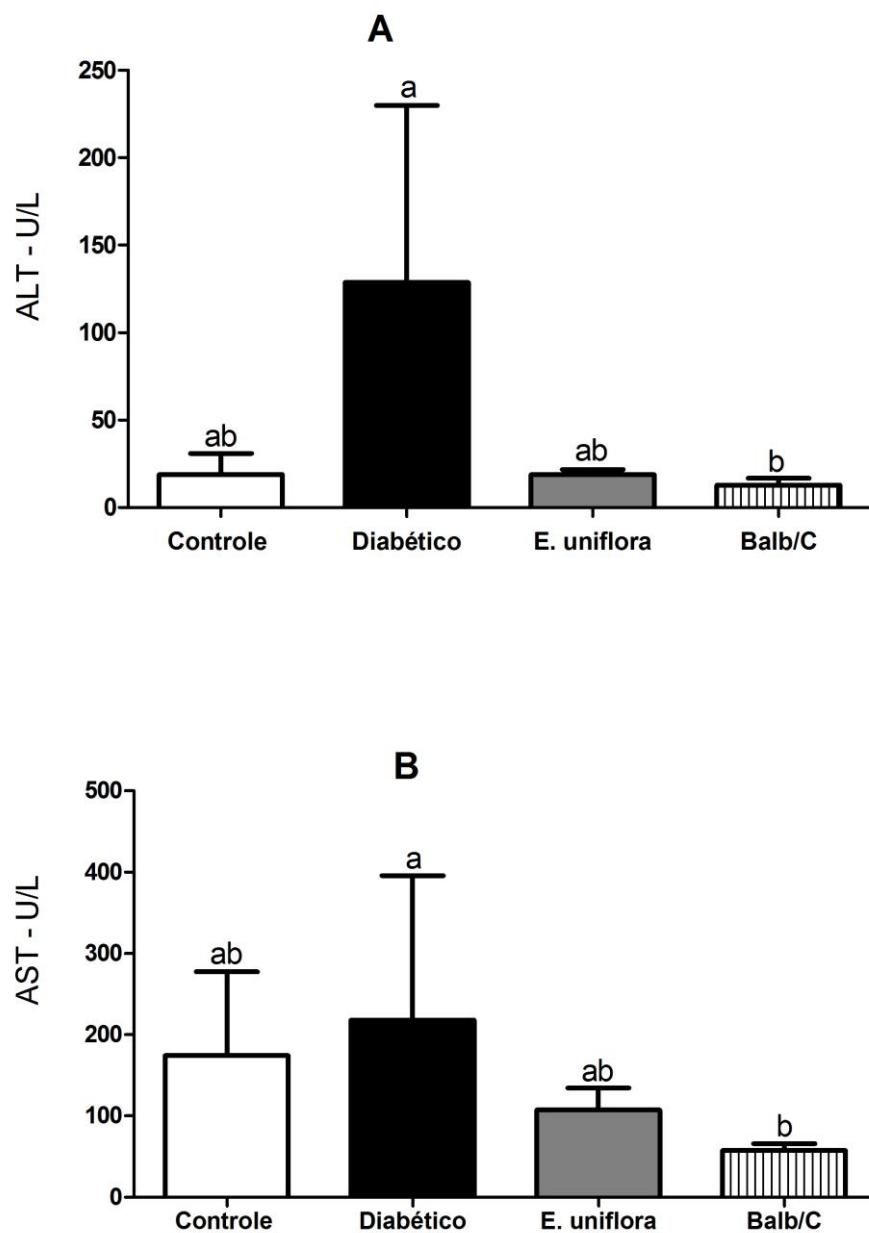


Figura 18. Gráfico representativo da concentração sérica de ALT (A) e AST (B). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão; as diferentes letras representam diferença estatística entre os grupos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.

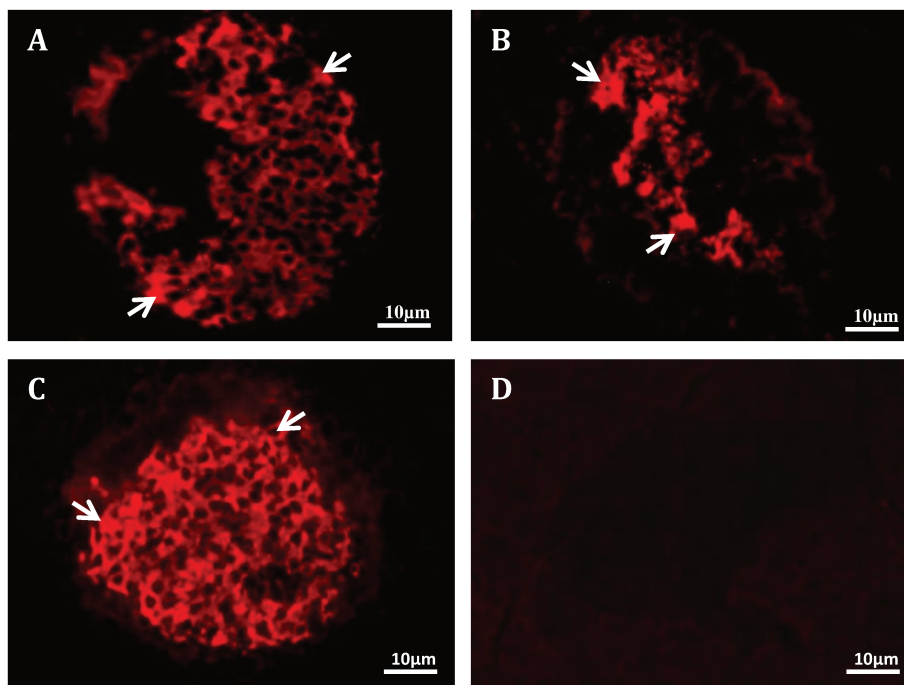
5.2.8. Imunofenotipificação de células insulina+, glucagon+, somatostatina+, GLP-1+

Na análise de porcentagem de células insulina+, os valores referentes à média da porcentagem de expressão nas ilhotas pancreáticas e desvio padrão de cada grupo foram 57,82% $\pm$ 25,2; 42,64% $\pm$ 35,1 e 70,27% $\pm$ 20,3 para os grupos controle, diabético e *E. uniflora*, respectivamente. Observamos que o grupo *E. uniflora* apresentou número superior de células marcadas quando comparado aos demais (Prancha II, pág. 68). A análise da imunofenotipificação de insulina apresentou diferença estatística entre *E. uniflora*/controle ($p < 0,05$), *E. uniflora* /diabético ($p < 0,001$) e controle/diabético não houve diferença estatística (Fig. 19, pág. 68).

A análise da expressão de células glucagon+ (Prancha III, pág. 69) as médias de porcentagem de expressão de células marcadas nas ilhotas pancreáticas e desvio padrão dos grupos controle (31,27% $\pm$ 21,9), diabético (44,38% $\pm$ 24,3) e *E. uniflora* (12,57% $\pm$ 13,1) Mostrou diferença estatística nos três grupos: diabético/controle ($p < 0,05$), controle/*E. uniflora* e diabético/*E. uniflora* ($p < 0,001$) (Fig. 20, pág. 69).

A média da porcentagem de células marcadas de somatostatina (Prancha IV, pág. 70) nas ilhotas do grupo diabético (53,07% $\pm$ 31,5) foi superior quando comparada ao grupo controle (42,23% $\pm$ 25,6) e grupo *E. uniflora* (14,43% $\pm$ 10,6) Assim como glucagon, observamos número elevado de células marcadas por somatostatina no grupo diabético, mas o grupo *E. uniflora* apresentou menor expressão quando comparado ao grupo controle. Houve diferença estatística entre os grupos controle/ *E. uniflora* ($p < 0,001$) e diabético/ *E. uniflora* ($p < 0,001$) e não apresentou diferença estatística no grupo diabético/controle (Fig. 21, pág. 70).

As médias de porcentagem e desvio padrão de células marcadas de GLP-1 (Prancha V, pág. 71) pela área total da ilhota foram 17,81% $\pm$ 16; 29,67% $\pm$ 21,8 e 12,29% $\pm$ 12,6 nos grupos controle, diabético e *E. uniflora*, respectivamente (Fig 22, pág. 71). A análise do GLP-1 mostrou diferença estatística entre os grupos controle/diabético ($p < 0,01$) e diabético/*E. uniflora* ($p < 0,001$), e não apresentou diferença estatística entre os grupos controle/*E. uniflora*.



Prancha II: Fotomicrografias representativas da imunofenotipificação de células insulina+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) *E. uniflora* e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcacão. Aumento de 200x. Barra=10µm.

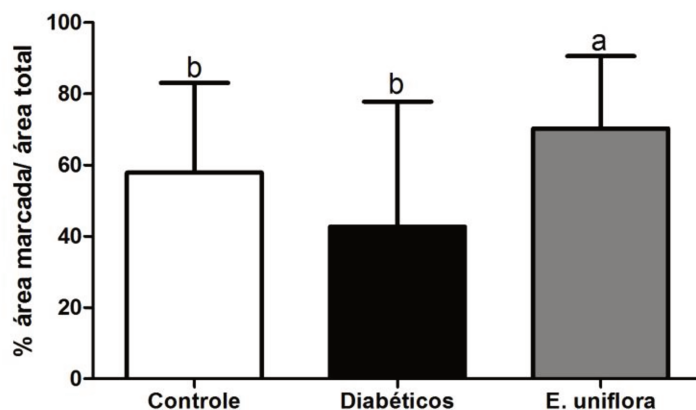
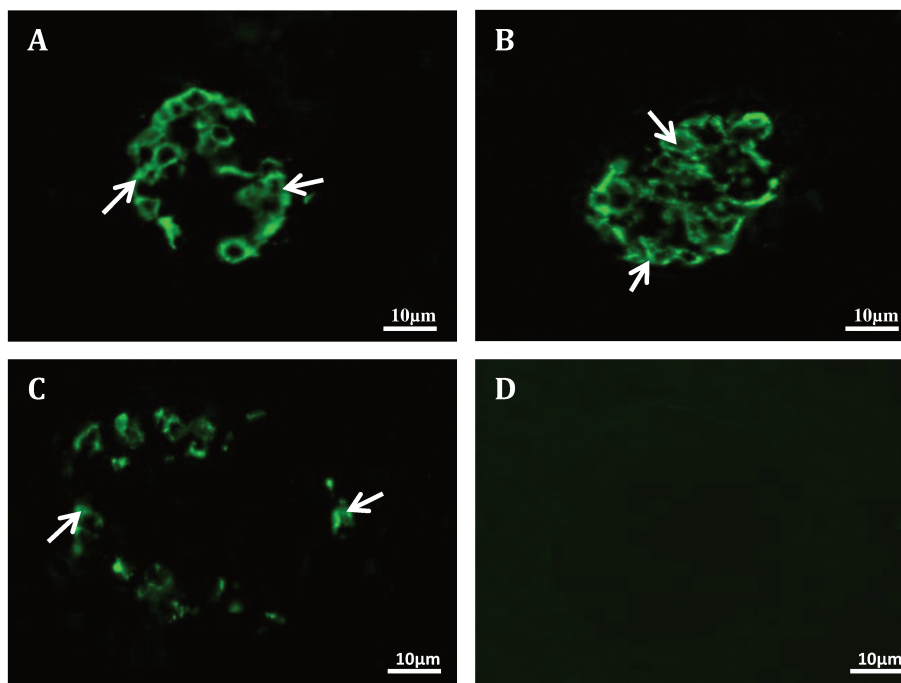


Figura 19: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células insulina+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *E. uniflora* (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$.



Prancha III: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) *E. uniflora* e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcagem. Aumento de 200x. Barra=10µm.

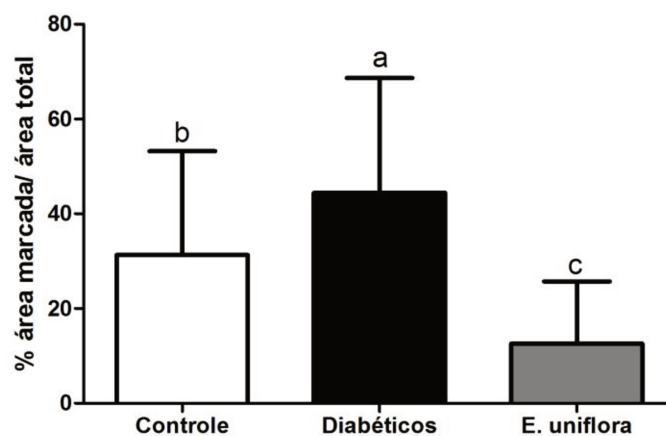
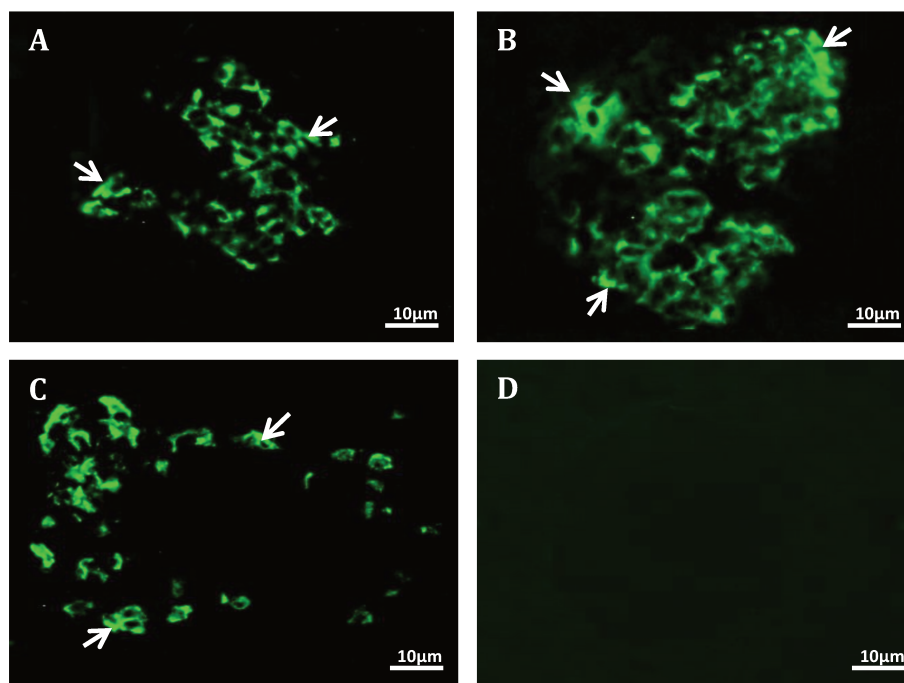


Figura 20: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células glucagon+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *E. uniflora* (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,05$; b/c: $p < 0,001$; a/c: $p < 0,001$.



Prancha IV: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) *E. uniflora* e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcção. Aumento de 200x. Barra=10µm.

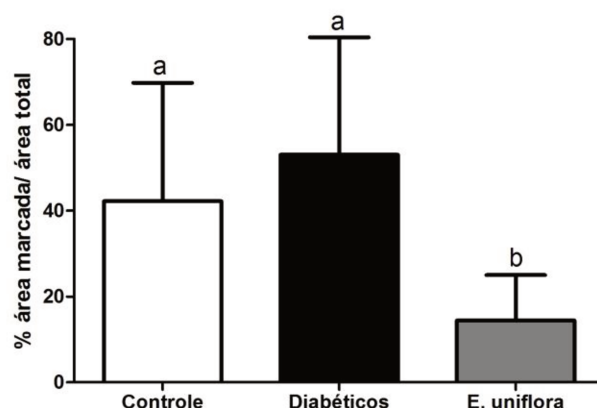
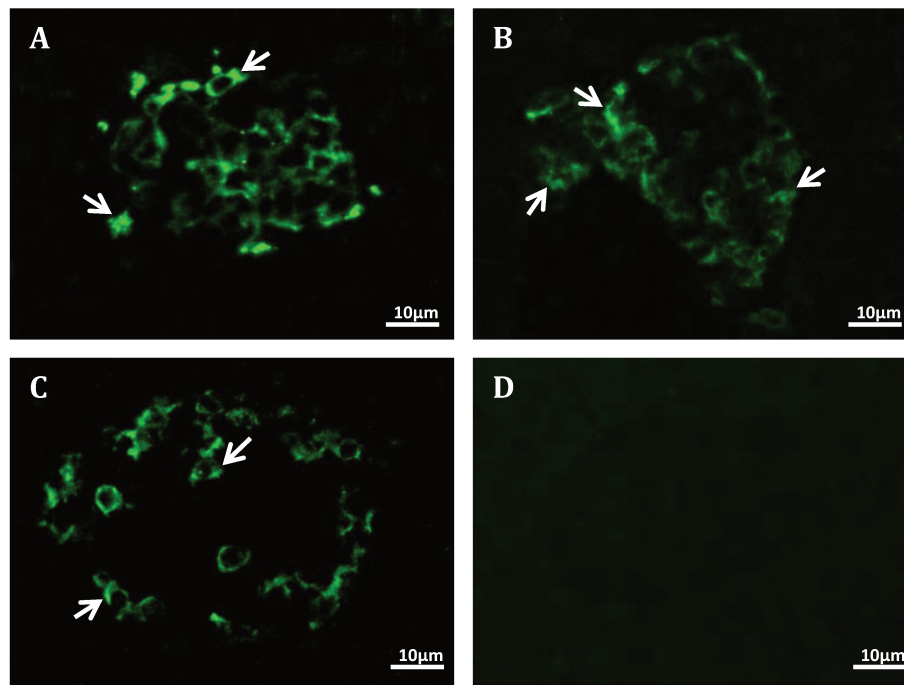


Figura 21: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células somatostatina+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *E. uniflora* (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,001$.



Prancha V: Fotomicrografias representativas de imunofenotipificação de células GLP-1+ nas ilhotas de camundongos NOD. A) controle, B) diabético, C) *E. uniflora* e D) Controle negativo do procedimento. n=3/grupo estudado, estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. As setas apontam para a imunomarcação. Aumento de 200x. Barra=10µm.

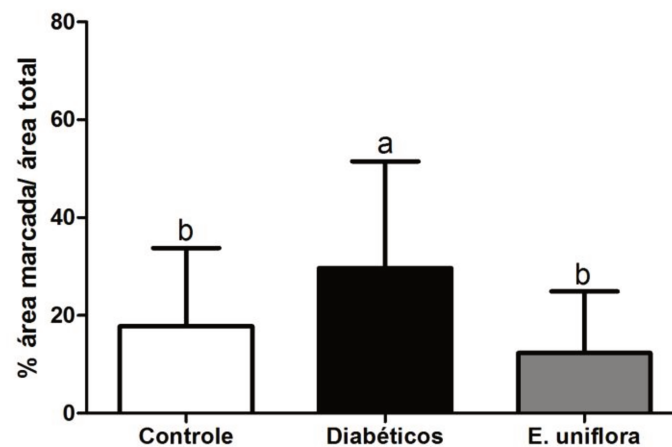


Figura 22: Gráfico representativo da imunofenotipificação de células GLP-1+ nas ilhotas, Controle não diabético, Diabético e *E. uniflora* (n=3/grupo estudado) estabelecendo-se a análise de 60 ilhotas por grupo. Teste estatístico ANOVA (Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns) e marcadores estatísticos a/b: $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos presentes em alimentos (frutas e vegetais), podem prevenir ou controlar algumas doenças, a partir de suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, anticancerígenas e antimicrobiana (84, 85).

Os métodos para a determinação e quantificação da atividade antioxidante total (AAT) propostos na literatura são diversos, porém dependem da natureza dos compostos presentes na constituição de cada fruta/folha, onde existem metodologias para frutos ricos em compostos lipofílicos e compostos hidrofílicos (86). Dessa forma, torna-se necessário a utilização de duas ou mais técnicas para a confirmação de atividade antioxidante, já que nenhum ensaio utilizado isoladamente consegue representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância, devido principalmente à complexidade dos compostos com capacidade antioxidante presente nos alimentos (84, 87).

No presente estudo avaliamos a eficiência extratora de três diferentes extratos (aquoso, etanol e metanol/acetona) considerando os compostos fenólicos das folhas secas de *E. uniflora*. Apesar do solvente etanol e metanol serem muito utilizados e efetivos para extração dos compostos fenólicos (88), nossos resultados demonstraram que a água em ebulição (autoclavagem) é o melhor solvente extrator. Recentemente, trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa relatou que o extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata* (maracujá doce) quando submetido à temperatura elevada, é capaz de extrair componentes com propriedades antiinflamatórias que diminuem o infiltrado de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas e reduzir, conseqüentemente, a incidência do diabetes na linhagem de camundongos NOD (62).

As análises antioxidantes dos extratos foram realizadas por 4 métodos (DPPH, FRAP,

ABTS e ORAC) e mostraram diferenças de comportamento onde essas podem estar relacionadas à interação dos solventes, estrutura química, pH e polaridade do solvente utilizado. Os valores da capacidade antioxidante só podem ser comparados quando as medições forem realizadas com o mesmo método de análise e no mesmo solvente; e a presença de componentes alimentares não antioxidantes (aminoácidos e ácidos urônicos) podem interferir na quantificação da atividade antioxidante no alimento estudado (89). Nas análises antioxidantes, o extrato aquoso apresentou atividade mais elevada quando comparado com os demais extratos (etanol e metanol/acetona). Bagetti *et, al.* (2011) (90), quantificaram a atividade antioxidante de três polpas da pitanga (roxa, vermelha e laranja) e assim como demonstramos na folha, atividade antioxidante elevada considerando os métodos FRAP e DPPH. É de grande importância notar a polaridade dos solventes utilizados pois afetam a doação de átomos de hidrogênio e a transferência de elétrons. Pérez-Jiménez e Calixto (2006) (89) estudaram a atividade antioxidante de constituintes alimentares pelos seguintes ensaios antioxidantes: DPPH, ABTS, FRAP e ORAC, e verificaram que há diferença entre os métodos, onde o ensaio de ORAC mostrou maior afinidade por solventes apolares enquanto ABTS por solventes polares, e os ensaios de DPPH e FRAP não apresentaram diferenças quanto ao solvente utilizado.

A identificação da composição centesimal dos alimentos, é relevante na definição do valor nutritivo e desta forma fornece a segurança do que será consumido. Em nossa análise de composição centesimal, onde quantificamos a concentração de carboidratos, minerais, umidade, fibras e proteínas nas folhas da *E. uniflora*, observamos índice elevado de carboidratos, coincidindo com as análises realizadas por Okoh-Esene *et, al.* (2011) (91) com as folhas e Moreno *et, al.* (2010) (92) com as sementes da *E. uniflora*.

Os alimentos funcionais estão em evidência na sociedade mundial, pela presença de antioxidantes que desempenham ação protetora no organismo, decorrentes da presença de compostos orgânicos com estruturas fenólicas (93, 94).

Os fenóis totais possuem atividade antioxidante que agem na neutralização dos radicais livres, contribuindo no controle do estresse oxidativo que ocorre nas ilhotas pancreáticas dos camundongos diabéticos (47). Nossos resultados, referentes a quantificação de fenóis totais mostraram que o extrato aquoso apresenta atividade antioxidante mais elevada e, por consequência, propriedade antiinflamatória demonstrada no modelo *in vivo* (62).

Alguns fatores como a localização, a sazonalidade e a estação do ano da coleta, podem influenciar a concentração dos compostos bioativos presentes nas plantas e a biossíntese de metabolitos secundários (flavonóides) na variação no potencial antioxidante e seus efeitos biológicos (95, 96).

Santos *et. al.* (2011) (97) estudaram os compostos fenólicos das folhas da *E. uniflora* em diferentes épocas do ano, as folhas eram secas, moídas e, após utilização da acetona como solvente extrator, o material então era liofilizado. Nossos resultados considerando o teor de fenóis totais e taninos hidrolisáveis apresentaram similaridade para as folhas coletadas no mês de setembro valores de 82,61 (mg/g amostra) e 112,21 (mg/g amostra), respectivamente.

Os taninos possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, e em sua análise nos 3 extratos estudados (aquoso, etanol e metanol/acetona) detectamos a presença de taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico). Alguns estudos relatam a presença de taninos hidrolisados nos extratos etanólicos e metanólicos das folhas de *E. uniflora*, contudo não avaliaram no extrato aquoso (75, 98).

A análise por cromatografia HPLC-DAD mostrou nos três extratos estudados, a partir dos 11 componentes majoritários, a presença de somente três deles (ácido gálico, ácido elágico e rutina). Oliveira *et al.* (2014) (99), embora não tenham analisado folhas e sim sementes de *E. uniflora* identificaram além da presença de ácido elágico, quercetina e campferol no extrato etanólico. Contudo a dificuldade para identificar os demais compostos deve-se a diversos fatores, como: fase móvel inadequada para a amostra analisada, tempo de retenção, a coluna utilizada, o comprimento de onda utilizada entre outros interferentes.

Doenças relacionadas ao estresse oxidativo, incluem a obesidade, doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, doenças neurodegenerativas, o câncer, o diabetes, entre outras (100). Desta forma, o estudo das propriedades de compostos antioxidantes nestas doenças é atrativo e vem se tornando cada vez mais popular, principalmente considerando-se que estes componentes estão em sua maioria em alimentos considerados funcionais.

O desenvolvimento do diabetes é resultado da destruição de células β (produtoras de insulina) nas ilhotas pancreáticas através de um processo inflamatório que pode ser gerado pelo estresse oxidativo. Colomeu *et al.* (2014) (62) mostraram que camundongos NOD tratados com antioxidantes (presentes no extrato aquoso das folhas de *Passiflora alata*) apresentaram diminuição no estresse oxidativo das ilhotas pancreáticas nesses animais.

Em nosso trabalho os camundongos NOD foram submetidos ao tratamento crônico (26 semanas) com extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*. Desta forma, verificamos a diminuição na incidência do diabetes, onde 60% dos camundongos controle apresentaram diabetes contra 40,7% dos animais tratados, constatando diferença de 19,3% na expressão do diabetes. Esta diferença pode ser representação de subpopulação mais susceptível ao tratamento, o que poderia ser comparado aos diferentes genótipos de resposta ao tratamento

na doença humana. Contudo, não descartamos a possibilidade dose dependente dos efeitos sobre o diabetes.

A insulite no camundongo NOD, inicia-se na 4ª semana de vida com progressão de células inflamatórias infiltrativas que ocorre em paralelo à destruição das células β (101). Os resultados obtidos quanto ao grau de infiltração das ilhotas pancreáticas, mostraram que nos animais do grupo *E. uniflora* apresentaram ilhotas de grau 2, ao passo que nos animais do grupo controle o grau de insulite foi 3. E por sua vez, o grupo diabético em sua maioria apresenta ilhotas em graus 2, 3 e 4. Vimos também que o grupo tratado apresenta maior número de ilhotas sem infiltrado inflamatório (16%), enquanto o grupo controle (4%) e diabético (1%). Com esses resultados, concluímos que os animais tratados com o extrato aquoso de *E. uniflora*, diminuíram significativamente o infiltrado de células da resposta imune nas ilhotas pancreáticas dos camundongos NOD.

Os resultados obtidos referentes à incidência da doença, grau de infiltrado e índice de insulite corroboram com nossa hipótese de trabalho, uma vez que a presença de flavonóides nas folhas de *E. uniflora* possuem atividade antiinflamatória e ação antidiabética que podem estar relacionados com a modulação da expressão de substâncias pro inflamatórias (102).

Nosso estudo é composto por resultados originais e inéditos, onde identificamos a presença de compostos fenólicos no extrato aquoso bruto das folhas da pitanga, que possuem propriedade antiinflamatória e antioxidante, possivelmente auxiliando na redução no grau de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas de camundongos NOD.

Considerando as atividades biológicas nos compostos caracterizados pela nossa análise de cromatografia HPLC – DAD, como o ácido gálico, ácido elágico e rutina; estes foram empregados em modelos experimentais de câncer, doenças inflamatórias e, em particular no

diabetes mellitus (103-107).

Al-Salih (2010) (103), estudou coelhos fêmeas diabéticas pelo modelo químico com aloxana (150mg/Kg). Posteriormente trataram estes animais diariamente durante três semanas com injeções de ácido tânico (100mg/Kg), ácido gálico (100mg/Kg) e o terceiro grupo com a mistura dos dois ácidos (tânico e gálico). Observaram que os níveis de glicose estavam diminuídos no grupo tratado com ácido tânico e a mistura dos ácidos, sendo assim concluíram que a ação sinérgica desses dois taninos hidrolisados possuem maior eficácia do que cada composto em ações isoladas como agente antioxidantes e antidiabéticos.

Malini *et al.* (2011) (104), estudando ratos wistar diabéticos induzidos quimicamente com estreptozotocina e posteriormente tratados com ácido elágico administrados por via oral; revelaram claramente que o ácido elágico possui efeito em diminuir a glicemia e aumentar significativamente os níveis de insulina plasmática em ratos diabéticos. Assim, concluíram que os flavonóides estimulam a secreção de insulina a partir de células β pancreáticas, podendo ser utilizados como agente terapêutico no tratamento do diabetes mellitus.

Jadhav *et al.* (2012) (105), estudaram a atividade hipoglicemiante e antidiabética de quatro compostos fenólicos: ácido elágico, quercetina, rutina e ácido bosvélico em ratos diabéticos induzidos quimicamente por estreptozotocina. Estes autores mostraram que a rutina tem atividade antioxidante superior aos outros 3 compostos fenólicos. O mecanismo de ação proposto advém do aumento da utilização de glicose periférica e a inibição da atividade transportadora de glicose para o intestino; e estes flavonóides podem estimular as células β a liberarem mais insulina.

Stanley e Kamalakkannan (2006) (106) ao administrar a rutina em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, observaram que não houve diminuição da insulina plasmática.

A rutina tem a propriedade de remover os radicais livres (antioxidantes) impedindo o estresse oxidativo e preservando as células β pancreáticas, tendo como consequência dois efeitos: aumento da secreção de insulina e diminuição da hiperglicemia.

As defesas antioxidantes podem ser classificadas em exógenas, provenientes da nossa alimentação e endógenas como GSH, SOD e CAT que atuam direta ou indiretamente em muitos processos biológicos incluindo a síntese de proteína, metabolismo e proteção celular (34, 108).

Verificamos que os animais tratados com extrato aquoso e os animais controle apresentaram níveis de GSH no fígado superiores aos animais diabéticos, mas no rim não observamos diferença entre os três grupos. O nível de glutathione elevado nos animais tratados e controle pode ser devido a conservação dessa enzima com ajuda dos compostos antioxidantes presentes no extrato aquoso.

Os níveis de GSH em células de mamíferos estão na faixa de 0,5 a 10 mmol L⁻¹ e alterações nesses valores podem indicar doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como o Diabetes mellitus. A redução do nível de glutathione no diabetes, potencializa os efeitos das espécies reativas de oxigênio. A GSH parece diminuir por dois mecanismos: o efeito direto da glicose e insulina sobre a síntese do GSH e pelo consumo do NADPH necessário para regeneração do GSSG, através da via poliol (109). A GSH também desenvolve um papel importante na morte celular incluindo a apoptose devido à queda desse antioxidante ocorre a redução das células β devido a apoptose das mesmas.

As enzimas hepáticas AST e ALT podem ser liberados dos hepatócitos para a circulação onde os seus níveis tornam-se elevados servindo como um marcador de lesão hepatocelular (30). O aumento dessas enzimas está relacionado com as alterações metabólicas

no fígado, tais como a cirrose hepática, hepatite, câncer do fígado, diabetes e administração de toxina (29). Em nossos resultados as dosagens de AST e ALT nos camundongos NOD e BALB/c, mostraram que os animais diabéticos possuem níveis destas enzimas hepáticas mais elevados que os animais não diabéticos. Estes níveis de enzimas hepáticas foram observados por Ashraf e Zare (2015) (110) em ratos wistar diabéticos induzidos com estreptozotocina.

A porção endócrina do pâncreas ou ilhotas de Langerhans, é constituída por grupos celulares distintos: células β (61% - produtoras de insulina), células α (16% - produtora de glucagon), células δ (9% - produtoras de somatostatina) e células produtoras do polipeptídeo pancreático (14%). A insulina inibe a secreção de glucagon e este estimula a de insulina; a somatostatina inibe ambas as secreções (insulina e glucagon). A insulina é liberada nos períodos pós-prandiais (após alimentação) e o glucagon nos períodos de jejum.

As células insulina+ foram identificadas por imunomarcção e encontradas em número mais elevado no grupo *E. uniflora* quando comparado aos grupos controle e diabético. O grupo tratado com o extrato aquoso juntamente com o grupo controle, apresentaram maiores níveis de insulina sérica comparando-se com o grupo diabético. Estes resultados corroboram com a literatura, onde no diabetes ocorre a destruição de células β pancreáticas que promove a diminuição da produção e secreção do hormônio insulina, e consequente preservação da célula β pelos mecanismos antioxidantes (111).

Além disso, a concentração mais elevada de insulina no grupo *E. uniflora* pode dar suporte aos resultados referentes à diminuição do infiltrado inflamatório em ilhotas do grupo tratado, já que o efeito do extrato aquoso parece estar relacionado com a preservação das ilhotas pancreáticas e, consequentemente, das células β produtoras de insulina. Estudo realizado por Gandhi *et al.* (2014) (112) mostraram os efeitos do ácido gálico administrados

em ratos diabéticos houve melhoria do transporte de glicose dependente de insulina no tecido adiposo e preservação da densidade de células- β , diminuindo os radicais livres. Concluíram que este agente antidiabético pode ser utilizado no tratamento de DM-2. Outros estudos (Sameermahmood *et al.* 2010) (113) relataram que o ácido gálico possui efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e citoprotetores, aumentando a secreção de insulina em células β RINm5F.

Quando avaliado o teste de tolerância a glicose e curva glicêmica, os grupos BALB/c e *E. uniflora* mantiveram a glicemia mais baixa enquanto os grupos controle e diabético apresentaram níveis glicêmicos superiores. O teste de tolerância a glicose pode ser utilizado para verificar se camundongos submetidos à administração em concentração elevada de glicose via oral é intolerante a glicose ou diabético (81). Considerando que camundongos BALB/c são saudáveis e não desenvolvem o diabetes e que o grupo *E. uniflora* não apresentou diferença estatística com este grupo, este resultado é interessante, já que os compostos presentes no chá parecem atuar na tolerância a glicose destes camundongos, fazendo com que os níveis glicêmicos permaneçam inferiores aos dos grupos controle e diabético na presença de glicose.

Células glucagon+ foram encontradas em maior quantidade no grupo diabético e em níveis inferiores no grupo controle e *E. uniflora*. É possível que devido ao mecanismo inflamatório ocorre a destruição de células β e estimulação das células alfa a produzirem glucagon para que o fígado possa quebrar o glicogênio e liberar glicose. A maior expressão de glucagon em animais diabéticos, desta forma, poderia ser justificada como um mecanismo compensatório a perda da insulina (114).

Assim como glucagon, células somatostatina+ foram encontradas em maior quantidade no grupo diabético e com menores níveis no grupo *E. uniflora*. Ludvigsen *et al.*

(2012) (115), relatou maior expressão de receptores de somatostatina em camundongos NOD hiperglicêmicos quando comparados a NOD normoglicêmicos, provavelmente por consequência dos níveis glicêmicos elevados ou devido ao processo inflamatório no pâncreas dos camundongos.

O GLP-1 (glucagon like-peptide-1) é derivado do proglucagon que é liberado no pâncreas e intestino (116). É um hormônio gastrointestinal que é secretado na circulação após a ingestão de alimentos que está envolvido no retardo da entrada de glicose na corrente sanguínea, supressão da produção de glucagon e regulação da síntese e secreção de insulina, atuando também na diferenciação, proliferação e sobrevivência de células β pancreáticas. O GLP-1 pode regular o crescimento das ilhotas pancreáticas por neogênese de células β a partir de células progenitoras dos ductos pancreáticos, e por replicação. A expressão deste hormônio se relaciona também à diminuição da incidência de DM-1 e de apoptose de células β em camundongos NOD pré-diabéticos tratados com GLP-1 humano (117). Em nossos resultados, a análise por imunomarcação de células GLP-1+ foram superiores em animais diabéticos, quando comparadas a área de células marcadas no grupo controle e no grupo *E. uniflora*. Rydgren *et. al.* (2012) (118) estudando o camundongo NOD, identificaram níveis elevados de GLP-1 em soros de camundongos NOD diabéticos quando comparados ao grupo controle não diabético. Os autores atribuíram este fato ao mecanismo compensatório dos camundongos NOD diabéticos para neutralizar a perda de células β e o aumento de células alfa nestas ilhotas, que poderia ativar o proglucagon a produzir GLP-1. Embora não tenhamos quantificado o GLP-1 em soros dos camundongos, a maior expressão do hormônio em animais diabéticos pode nos sugerir, também, mecanismo compensatório à perda de insulina em consequência a diminuição do número de células β .

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

1. As análises das atividades antioxidantes nos extratos aquoso, etanol e metanol-acetona mostrou que o extrato aquoso apresenta maior atividade antioxidante, o que pode facilitar o seu preparo doméstico.
2. Os três compostos majoritários (ácido elágico, ácido gálico e rutina) encontrados nos três extratos estudados, possuem atividade antiinflamatória e antidiabética.
3. Os animais tratados com extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* apresentaram redução de 19,3% no diabetes quando comparados aos animais do grupo controle. A menor incidência da doença em animais tratados é resultado dos efeitos antiinflamatórios nas ilhotas pancreáticas destes animais. Quando analisados os graus de lesão em ilhotas pancreáticas de camundongos NOD tratados, verificamos diminuição no índice de infiltrado inflamatório com ilhotas mais conservadas que as dos grupos controle e diabético.
4. Os níveis de insulina sérica mostraram-se superiores nos grupos tratados e controle quando comparados ao grupo diabético. O teste de tolerância mostrou que a concentração da glicemia do grupo tratado com o extrato aquoso das folhas de pitanga assemelha-se ao grupo BALB/c grupo controle sadio de linhagem não relacionada e que não desenvolve o diabetes. A concentração de glutatona hepática

nos camundongos NOD tratados com o extrato aquoso de *E. uniflora* e o grupo controle estavam mais elevadas que nos animais diabéticos e a glutathiona renal mostrou-se estatisticamente igual nos três grupos estudados.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento crônico dos camundongos NOD com o extrato aquoso das folhas secas de *E. uniflora* apresentou resultados promissores. Reduzindo a incidência do DM-1, reduzindo o infiltrado celular, elevando os níveis de insulina sérica no grupo tratado, que pode sugerir além de diminuição do processo inflamatório, conservação de células β pancreáticas produtoras de insulina. Estes resultados podem representar a ação dos compostos fenólicos presentes nas folhas de *E. uniflora*, que possuam ação antioxidante e propriedade antiinflamatória.

Contudo, apesar dos efeitos promissores que encontramos durante esse trabalho, serão necessários estudos complementares para identificar os efeitos de dose/resposta do extrato aquoso, bem como sua dose diária, objetivando consolidar e transferir estes resultados para estudos clínicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. [Internet]. 1999.
2. Wasserfall CH, Atkinson MA. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Reviews*. 2006;5(6):424-8.
3. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
4. Wasserfall CA M. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmunity reviews*. 2006;5:424-8.
5. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest*. 2001;108:1237-52.
6. Seissler J, Scherbaum WA. Are we ready to predict and prevent endocrine/organ specific autoimmune diseases? *Springer Semin Immunopathol*. 2002;24:273-95.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. . 2007;6ª edição.
8. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;2(7892):1279-83.
9. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ. Diabetes Mellitus: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq Bras Endocrinologia & Metabologia*. 2002;146(1):16-26.
10. Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 2003;9(2):198-205.
11. Vieira KP, Zollner ASLAR, Malaguti C, Vilella CA, Zollner RL. Ganglioside GM1 effects on the expression of nerve growth factor (NGF), Trk-A receptor, proinflammatory cytokines and on autoimmune diabetes onset in non-obese diabetic (NOD) mice. *Cytokine*. 2008;42(1):92-104.
12. Lara FA. Utilização do camundongo NOD (Non-obese diabetic) como modelo de estudo sobre a eficácia da autohemoterapia. 2010. Available from: www.rnsites.com.br/auto-hemoterapia-camundongos.pdf.
13. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29(1):1-13.
14. Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. . *Arq Bras Endo Metabol*. 1994;38:105-8.
15. Bach JF. Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases. *Arthritis*. 2002;4(3):3-15.
16. Kikutani H, Makino S. The Murine Autoimmune Diabetes Model: NOD and Related Strains. *Advances in immunology* 1992;51:285-322.
17. Mark S, Bluestone JA. The NOD Mouse: A Model of Immune. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:447-85.
18. Graser RT, DiLorenzo TP, Wang F, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, et al. Identification of a CD8 T Cell That Can Independently Mediate Autoimmune Diabetes Development in the Complete Absence of CD4 T Cell Helper Functions. *The Journal of Immunology*. 2000;164:3913-8.

19. Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway JCA. CD8T cell from young nonobese diabetic (NOD) Islet can transfer rapid onset of diabetes in NOD Mice in the absence of CD4 cells. *JExpMed*. 1996;183:67-76.
20. Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK, Fathman CG. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science*. 1988;240(4852):659-62.
21. Nagata M, Santamaria P, Kawamura T, Utsugi T, Yoon JW. Evidence for the role of CD8+ cytotoxic T cells in the destruction of pancreatic beta-cells in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1994;152(4):2042-50.
22. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death-the-signal-transduction of immune-mediated beta- cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115-33.
23. Filippi CM, Estes EA, Oldham JE, von Herrath MG. Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1515-23.
24. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
25. Gardner CD, Eguchi S, Reynolds CM, Eguchi K, Frank GD, Motley ED. Hydrogen Peroxide Inhibits Insulin Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 2003;228:836-42.
26. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:1656-66.
27. Chandra D, Jackson EB, Ramana KV, Kelley R, Srivastava SK, Bhatnagar A. Nitric Oxide Prevents Aldose Reductase Activation and Sorbitol Accumulation During Diabetes. *Diabetes*. 2002;51:3095-101.
28. Contreras-Calderón J, Calderón-Jaimes L, Guerra-Hernández E, García-Villanova B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*. 2010;10(16):1-7.
29. Baynes JW, Thorpe SR. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications . A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*. 1999;48:1-7.
30. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*. 2005;54:1615-25.
31. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products : Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*. 2006;114:597-605.
32. Chen A, S., Taguchi T, Sugiura M, Wakasugi Y, Kamei A, Wang MW, et al. Pyridoxal-Aminoguanidine Adduct is More Effective than Aminoguanidine in preventing Neuropathy and Cataract in diabetic rats. *Horm Mtab*. 2004;36(3):183-7.
33. Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Obberghen EV. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Advanced Glycation End Products. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;27(47):43836-41.
34. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38.
35. Bhatia S, Shukla R, Venkata S, Gambhir JK, Prabhu KM. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry*. 2003;36:557-62.
36. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative Stress at Onset and in Early Stages of type 1 Diabetes in Children and Adolescents. *Diabetes Care*. 1998;21:1736-42.
37. Hata I, Kaji M, Hirano S, Shigematsu Y, Tsukahara H, Mayumi M. Urinary oxidative stress markers in young patients with type 1 diabetes. *Pediatrics International*. 2006;48:58-61.

38. Reis JS. Diabetes tipo 1: Estudo da associação entre o balanço oxidante/antioxidante com parâmetros clínicos e bioquímicos. Belorizonte, Programa de Pós- graduação e pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte. 2006.
39. Vessby J, Basu S, Mohsen R, Berne C, Vessby B. Oxidative Stress and antioxidant status in type 1 diabetes mellitus J Intern Med. 2002;251(1):69-76.
40. Devasdagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. Japi. 2004;52(794-804).
41. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. Encyclopedia of life sciences. 2005;1:1-7.
42. Valko M, Leibfritz DL, Mancol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2007;39:44-84.
43. Temple NJ. Antioxidants and Disease: More Question Than Answers. Nutrition Research. 2000;20(3):449-59.
44. Cerqueira FM, Medeiros MHG, August O. Antioxidantes dietéticos : controvérsias e perspectivas. Quim Nova. 2007;30(2):441-9.
45. Aherne SA, O'brien NM. Dietary flavonols : chemistry, food content, and, metabolism. Nutrition Research. 2002;18(1):75-81.
46. Burns J, Gardner PT, Matthews D, Duthie GC, Lean MEJ, Crozler A. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. J Agric Food Chem. 2001;49:5797-808.
47. Sousa CMM, Silva HR, Vierira-Jr GM, Ayres MCC, Da Costa LS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. . Quimica Nova. 2007;30(2):212-7.
48. Lorenzi H, MATOS FJA. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2002.
49. Auricchio MT, Bacchi EM. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. Rev Inst Adolfo Lutz. 2003;62(1):55-61.
50. Schapoval EE, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. J Ethnopharmacol. 1994;44(3):137-42.
51. Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, Franco L, Ferro E, de Arias AR. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. J Ethnopharmacol. 1987;21(2):183-6.
52. Velazquez E, Tournier HA, Mordujovich de Buschiazzi P, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia. 2003;74(1-2):91-7.
53. Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. J Ethnopharmacol. 1999;68(1-3):307-14.
54. Kraus TEC, Dahlgren RA, Zasoski RJ. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. Plant and Soil. 2003;256:41-66.
55. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EM, Amorim ELC. Tannis: from chemistry to ecology. Química Nova. 2005;28(5):592-6.
56. Okuda T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry. 2005;66(17):2012-31.
57. Auricchio MT, Bugno A, Barros BMS, Bacchi EM. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. Latin American Journal of Pharmacy. 2007;26(1):76-81.
58. Fiuza TS, Rezende MH, Sabóia-Morais SMT, Bara MTF, Tresvenzol LMF, Paula JR. Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Revista Eletrônica de Farmácia. 2008;5(2):21-31.

59. Silva MR, Silva MAAP. Nutritional aspects of phytates and tannins. *Revista de Nutrição*. 1999;12(1):5-19.
60. Sarwar Gilani G, Wu Xiao C, Cockell KA. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *The British journal of nutrition*. 2012;108 Suppl 2:S315-32.
61. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Available from: www.cites.org.
62. Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CB, Schumacher NS, Marostica MRJ, Meletti LM, et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *Int Immunopharmacol*. 2013;18(1):106-15.
63. Chamorro S, Goñi I, Viveros A, Hervert-Hernández D, Brenes A. Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatment of grape seed extract and grape pomace. *Eur Food Res Technol*. 2012;234:147-55.
64. Spagolla LC, Santos MM, Passos LML, Aguiar CL. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo "Rabbiteye" (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2009;30(2):59-64.
65. Larrauri JA, Ruperez P, Saura Calixto F. Mango peel fibres with antioxidant activity. *Z Lebensm Unters F A*. 1997;205(1):39-42.
66. Brand-Williams W, Cuverlier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 1995;28:25-30.
67. Benzie SE, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
68. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ abtioxidant power assay. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 2000;48:3396-402.
69. Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. Estimation of scavenging activity of Phenolic compounds using the ABTS assay. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 2004;52:4669-74.
70. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and food chemistry* 2003;51:3273-9.
71. Siger A, Nogala-Kalucka M, Lampart-Szczpa E. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of food Lipids*. 2007;15:137-49.
72. Association of Official Analytical chemists 18th ed. Gaithersburg:: AOAC International.; 2006.
73. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959;37(8):911-7.
74. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Insituto Adolfo Lutz. 1985;1:21-43.
75. Viana FC, Santana ACM, Moura RMX. Phytochemistry identification of flavonoids and tannins in leaves of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) Traditionally used in southern Bahia. *Nucleo de Apoio e Desenvolvimento a Pesquisa*. 2012;1.
76. Brune M, Rossander-Hultén L, Hallberg L, Gleerup A, Sandberg AS. Iron Absorption from Bread in Humans: Inhibitng Effects of Cereal Fiber, Phytate and Inositol Phosphates with Diferent Numbers of Phosphate Groups1. *Human and Clinical Nutriton*. 1992;122(3):442-9.
77. Schons PF, Edi FR, Battestin V, Macedo GA. Effect of enzymatic treatment on tannins and phytate in sorghum (*Sorghum bicolor*) and its nutritional study in rats. . *Food Science and Technology*. 2011;46:1253-8.
78. Sánchez-Moreno C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*. 2002;8(121-137).
79. Signore A, Pozzilli P, Gale EA, Andreani D, Beverley PC. The natural history of lymphocyte subsets infiltrating the pancreas of NOD mice. *Diabetologia*. 1989;32(5):282-9.

80. Leiter EH. The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan [et al]. 2001;Chapter 15:Unit 15 9.
81. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;295(6):E1323-32.
82. Hartree EF. Determination of the lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*. 1972;48:422-7.
83. Faure P, Lafond JL. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. *Analysis of free radicals in biological systems*. Boston-Berlin: Birkhäuser Basel; 1995. p. 237-48.
84. Sucupira NR, Silva AB, Pereira G, Costa JN. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. *UNOPAR*. 2012;14(4):263-9.
85. Degáspari CM, Waszczynskyj N. Antioxidants properties of phenolic compounds. *Visão Acadêmica - Curitiba*. 2004;5(1):35-40.
86. Silva WS. Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira.: Universidade Federal do Ceará.; 2008.
87. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:1841-56.
88. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J Agric Food Chem*. 2003;51:2144-55.
89. Perez-Jimenez J, Calixto FS. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*. 2006;39:791-800.
90. Bagetti M, Facco EMP, Piccolo J, Hirsch GE, Rodriguez-Amaya D, Kobori CN, et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)*. 2011;31(1):147-54.
91. Okoh-Esene., Uchechukwu R, Hussein SJ, Asuquo TS. Proximate and phytochemical analysis of leaf, stem and root of *Eugenia uniflora* (Surinam or Pitanga cherry). *Scholars Research Library*. 2011;1(4):1-4.
92. Moreno DLM, Bertanha BJ, Jorge N. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) seeds: antioxidant potential and fatty acids profile. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):175-80.
93. Kalt W, Kushad MM. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Plant and Human Health: Introduction to the Colloquium. *HortScience*. 2000;35(4):572.
94. Prior RL, Cao G. Antioxidant Phytochemicals in Fruits and Vegetables: Diet and Health Implications. *HortScience*. 2000;35(4):588-92.
95. Jaakola L, Hohtola A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell & Environment*. 2010;33:1239-47.
96. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 2004;84:329-39.
97. Santos RM, Fortes GAC, Ferri PH, Santos SC. Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011;21(4):581-6.
98. Lee MH, Nishimoto S, Yang LL, Yen KY, Hatano T, Yoshida T, et al. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. *Phytochemistry*. 1997;44(7):1343-9.
99. Oliveira AL, Destandau E, Fougere L, Lafosse M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*. 2014;145:522-9.
100. Gottlieb MG, Morassutti AL, Cruz IBM. Transição epidemiológica, estresse oxidativo e doenças crônicas não transmissíveis sob uma perspectiva evolutiva. *Scientia Medica*. 2011;21(2):69-80.

101. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:447-85.
102. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences.* 2004;96(3):229-45.
103. Al-Salih RMH. Clinical Experimental Evidence: Synergistic Effect of Gallic Acid and Tannic acid as Antidiabetic and Antioxidant Agents. *Medical Journal* 2010;4:109-19.
104. Malini P, Kanchana G, Rajadurai M. Antibiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin induced Diabetes mellitus in albino wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 2011;4(3):124-8.
105. Jadhav R, Puchchakayala G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2012;4(2):251-6.
106. Stanley MPP, Kamalakkannan N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 2006;20(2):96-102.
107. Rogerio AP, Fontanari C, Borducchi E, Keller AC, Russo M, Soares EG, et al. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. *European Journal of Pharmacology.* 2008;580(1-2):262-70.
108. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of Antioxidants. *Fd Chem Toxic.* 1995;33(7):601-17.
109. Styskal J, Remmen HV, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med.* 2012;52:46-58.
110. Ashraf H, Zare S. Preventive Effects of Aqueous Extract of *Berberis integerrima* Bge. Root on Liver Injury Induced by Diabetes Mellitus (Type 1) in Rats. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR.* 2015;14(1):335-43.
111. Robertson RP. Antioxidant drugs for treating beta-cell oxidative stress in type 2 diabetes: glucose-centric versus insulin-centric therapy. *Discovery medicine.* 2010;9(45):132-7.
112. Gandhi GR, Jothi G, Antony PJ, Balakrishna K, Paulraj MG, Ignacimuthu S, et al. Gallic acid attenuates high-fat diet fed-streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR γ in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway. *European Journal of Pharmacology.* 2014;745:201-16.
113. Sameermahmood Z, Raji L, Saravanan T, Vaidya A, Mohan V, Balasubramanyam M. Gallic acid protects RINm5F beta-cells from glucolipotoxicity by its antiapoptotic and insulin-secretagogue actions. *Phytotherapy research : PTR.* 2010;24 Suppl 1:S83-94.
114. Nery M. Hypoglycemia as a Limiting Factor in the Management of Type 1 Diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2008;52(2):288-98.
115. Ludvigsen E, Stridsberg M, Janson ET, Sandler S. Altered expression of somatostatin receptors in pancreatic islets from NOD mice cultured at different glucose concentrations in vitro and in islets transplanted to diabetic NOD mice in vivo. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:623472.
116. Mojsov S, Weir GC, Habener JF. Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest.* 1987;79(2):616-9.
117. Zhang J, Tokui Y, Yamagata K, Kozawa J, Sayama K, Iwahashi H, et al. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2007;50(9):1900-9.

118. Rydgren T, Borjesson A, Carlsson A, Sandler S. Elevated glucagon-like peptide-1 plasma levels, as a possible adaptive response, in diabetic NOD mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(3):583-7.

ANEXO I – Identificação da *Eugenia uniflora*



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
CENTRO de HORTICULTURA
AV. BARÃO DE ITAPURA, 1481
CAIXA POSTAL 28
13.012-970 - CAMPINAS - SP

DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE

Declaramos, **para fins de pesquisa científica**, que o material vegetal ora submetido ao Instituto Agronômico para análise morfológica e classificação botânica refere-se a folhas da espécie arbórea pitangueira (*Eugenia uniflora* L.).

O material analisado foi devidamente coletado em plantas de pé franco, não transgênicas, nem submetidas a tratamentos mutagênicos. Assim, poderá ser utilizado para pesquisas científicas com fins farmacológicos e/ou medicinais, sem comprometimento da qualidade dos extratos resultantes.

Informamos, adicionalmente, que há possibilidade do fornecimento de amostras adicionais deste mesmo lote, para fins de pesquisa, nos meses de fevereiro a julho de 2014 e 2015, período subsequente ao florescimento e frutificação da espécie.

Campinas, 22 de agosto de 2013.

Laura Maria Molina Meletti
Pesquisador Científico VI
Instituto Agronômico
Centro de Horticultura

ANEXO II - Comissão de Ética no Uso de Animais



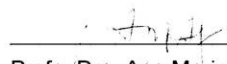
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Caracterização da propriedade antiinflamatória dos componentes do extrato aquoso da folha Eugenia uniflora sobre a expressão do diabetes, no modelo experimental de diabetes espontâneo tipo 1 (camundongos NOD)" (protocolo nº 2824-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner / Nayara Simon Gonzalez Schumacher, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 05 de setembro de 2012.

Campinas, 05 de setembro de 2012.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>