UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGA) E DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS EM CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA

SIMONÍ MARINÉIA BRAATZ

Ponta Grossa

2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPROTETOR DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGA) E DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS EM CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Profª. Drª. Henriette Rosa de Oliveira Emilio

Co-orientador: Profª. Drª. Carla Cristine Kanunfre

Ponta Grossa

2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

B794a

Braatz, Simoní Marinéia

Avaliação do efeito citoprotetor do extrato bruto das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e de compostos bioativos isolados em células secretoras de insulina. / Simoní Marinéia Braatz. Ponta Grossa, 2010.

130f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração : Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná.

Orientador : Profa. Dra. Henriette Rosa de Oliveira Emilio

Co-orientador : Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre

1. Antioxidantes. 2. Citoproteção. 3. Citotoxicidade. 4. Flavonóides. 5. Peróxido de hidrogênio.

I. Oliveira-Emilio, Henriette Rosa de. II. Kanunfre, Carla Cristine. III. T.

CDD : 575

Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 08/2009

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **SÍMONI MARINÉIA BRAATZ.**

Aos vinte e dois do mês de fevereiro de dois mil e dez, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Drª Henriette Rosa de Oliveira Emílio, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno(a) **SÍMONI MARINÉIA BRAATZ,** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Henriette Rosa de Oliveira Emílio (Orientadora), Dr. Giovani Marino Faveró e Drª Márcia Regina Paes de Oliveira. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Avaliação do Efeito Cito protetor do Extrato Bruto das Folhas de Eugenia Uniflora L. (pitanga) e de Compostos Bioativos Isolados em Células Secretoras de Insulina.** Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADA.** A Presidência ressalvou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de dois mil e dez.

Profª Dr.ª Henriette Rosa de Oliveira Emílio_____

Prof. Dr. Giovani Marino Faveró_____

Profª Drª Márcia Regina Paes de Oliveira_____

Ao meu pai, Wilfried, pelo apoio e amor que sempre me dedicou e à minha mãe, Sônia, que me abraçaria com orgulho neste momento, pelos ensinamentos e sabedoria que agora fazem parte de mim.

Ao meu namorado, Sérgio, por todo carinho, palavras de incentivo, companhia, compreensão e, principalmente, paciência.

Agradecimentos

A Deus, por tudo que em minha vida acontece.

À minha orientadora profª. Drª. Henriette Rosa de Oliveira Emilio, exemplo de competência, por toda confiança, carinho, incentivo, dedicação, conselhos e paciência, não poupando ensinamentos para a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora profª. Drª. Carla Cristine Kanunfre, exemplo de dedicação, por toda disposição e colaboração durante esses dois anos de convivência no laboratório, sem esquecer de seus preciosos conselhos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva que colaboraram, seja com material, equipamento, espaço físico ou conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho e que estavam sempre solícitos a prestar auxílio e esclarecimentos. Dentre eles os professores Dr. Roberto Ferreira Artoni, Drª. Maria Albertina de Miranda Soares e Dr. Giovani Marino Fávero.

Ao prof. Dr. Rui Curi, por gentilmente ter doado a linhagem celular utilizada como modelo de estudo neste trabalho.

Ao prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli que gentilmente disponibilizou seu laboratório para execução da técnica de radioimunoensaio para determinação da secreção de insulina. À Marlene Santos da Rocha pelo valioso auxílio na determinação da secreção de insulina.

A profª. Drª. Eliana Beleski Borba Carneiro e prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana que nos auxiliaram e disponibilizaram seus laboratórios para extração e concentração dos extratos. Ao técnico Renoaldo Kaczmarech pelo auxílio na identificação da espécie e preparação da exsicata depositada no herbário da UEPG.

A profª. Drª. Márcia Regina Paes de Oliveira, por todos os esclarecimentos para a análise morfológica das células RINm5f. À profª. Drª. Maria Eugênia Costa, chefe do Departamento de Biologia Geral, pela compreensão e ajuda com horários, quadro de aulas e disciplinas a serem ministradas para este departamento.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, entre eles, Juliana, Elise e em especial a Aline, que de alguma forma me ajudaram, e, principalmente, pela sincera amizade. As técnicas dos laboratórios, Maria Inês Cordeiro e Dona Marli Lang de Oliveira, por todo auxílio.

"Experience is not what happens to a man;

it is what a man does with what happens to him."

(Aldous Huxley)

Resumo

Folhas de pitanga são popularmente utilizadas no tratamento alternativo do diabetes mellitus. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante, citotóxica e citoprotetora dos extratos brutos das folhas de *Eugenia uniflora* L. e de compostos encontrados nos extratos: quercetina (QE) e miricetina (MI), além do efeito destes sobre a funcionalidade de células RINm5f. As metodologias utilizadas foram: Folin-Ciocalteau, redução do MTT, captura do DPPH, coloração por hematoxilina e eosina, radioimunoensaio e *Western Blot*. O conteúdo total de fenóis obtido nos extratos foi 440,27µg/mL e 37,83µg/mL equivalentes de catequina/mg de extrato aquoso (EA) e alcoólico (EE), respectivamente. No ensaio de captura do DPPH, o EA apresentou um IC50 de 321,50µg/mL, a MI de 152,63µg/mL e a QE de 110,278µg/mL. O EE não apresentou significativa atividade antioxidante. O EA e o EE não apresentaram citotoxicidade nas concentrações entre 12,5 - 75µg/mL e 31,25 - 500µg/mL, respectivamente. Já a QE e MI são mais citotóxicas, apresentando viabilidade celular superior a 90% entre 3,13 - 6,25µg/mL e 3,13 - 12,5µg/mL, respectivamente. Quanto à funcionalidade celular, o EA e a QE não interferiram na secreção de insulina. A MI causou redução na secreção de insulina na concentração de 3,13µg/mL enquanto o EE aumentou mais de 3 vezes a secreção deste hormônio. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reduziu, em média, 33% da viabilidade das células no ensaio agudo e 45% no ensaio crônico. O EA promoveu citoproteção principalmente no ensaio crônico e nas maiores concentrações testadas. Já o EE apresentou citoproteção apenas quando incubado cronicamente. A QE apresentou resultado dose-dependente (6,5 > 3,13µg/mL) no ensaio agudo e preveniu 100% dos danos causados pelo H_2O_2 no ensaio crônico. Um possível mecanismo de ação relacionado com a proteção dos extratos e compostos isolados é o bloqueio da ativação do NF-κB pelo H_2O_2. Além disso, o H_2O_2 alterou a adesão intercelular com intensa modificação na morfologia destas. As células apresentaram formato mais arredondado, com formação de pregas na membrana e redução da basofilia citoplasmática. Os extratos e compostos isolados preveniram alterações na morfologia causadas por H_2O_2, sugerindo prevenção da peroxidação lipídica. Não houve variação na concentração protéica da superóxido dismutase (SOD), BAX, dissulfito isomerase (PDI) e GRP94 (proteína regulada por glicose), entretanto houve aumetno da concentração da proteína GRP78 indicando estresse reticular. Os resultados apresentados são um indicativo de que a *E. uniflora L.* possa ser usada no tratamento alternativo do diabetes mellitus.

Palavras-chave: antioxidantes, citoproteção, citotoxicidade, flavonóides, peróxido de hidrogênio.

Abstract

Surinam cherry leaves are popularly used as an alternative treatment for diabetes mellitus. They are rich in phenolic compounds which have antioxidant properties. Besides, it is well known that reactive species influence in the progression of diabetes. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, cytotoxic and cytoprotective activity of the crude leaf extracts of *Eugenia uniflora* L. and some major components of the extracts, quercetin (QE) and myricetin (MI); and the effect of these substances on the functionality of RINm5f cells. The methodologies performed were: Folin-Ciocalteau method, MTT reduction, DPPH method, hematoxylin-eosin stain, radioimmunoassay and *Western Blot* analyses. The total phenolic content obtained for the extracts was 440.27µg/mL and 37.83µg/mL catechin equivalent/mg of aqueous extract (AE) and ethanol extract (EE), respectively. In the DPPH essay, the IC50 of AE was 321.50µg/mL, MI was 152.63µg/mL and QE was 110.278µg/mL. The EE didn't show significant antioxidant activity. The AE and the EE are not cytotoxic in the concentrations between 12.5 - 75µg/mL and 31.25 - 500µg/mL, respectively. QE and MI are not cytotoxic in the concentrations between 3.13 – 6.25µg/mL and 3.13 – 12.5µg/mL, respectively. Most of the compounds didn't interfere in insulin secretion, except for EE, which increased at least 3 times insulin secretion and MI which decreased insulin secretion in its lower concentration tested. Hydrogen peroxide (H_2O_2) induced a reduction of 33% of cell viability in acute assay and 45% in chronic assay. The AE had a cytoprotective effect mainly in the chronic assay and in its higher concentrations. The EE had a similar effect only when chronically tested. QE showed a dose-dependent result (6.5 > 3.13µg/mL) in the acute assay and prevented 100% of the damage caused by H_2O_2 in the chronic assay. One possible cytoprotective mechanism for these compounds and extracts is the inhibition of the activation of NF-κB. Besides that, H_2O_2 altered intercellular adhesion with intense modification of cellular morphology. The cells presented a round shape, with the formation of folds in the membrane and reduction of cytoplasm basophily. Both extracts and isolated compounds also prevented changes in morphology caused by H_2O_2, suggesting prevention of lipid peroxidation. There was no variation in the expression of the proteins superoxide dismutase (SOD), Bax, disulfide isomerase (PDI) and GRP94 (glucose-regulated protein), however, the increased protein content of GRP78 was an indicative of reticular stress. These results are an evidence that *Eugenia uniflora* L. can be used as an alternative treatment for diabetes mellitus.

Key words: antioxidants, cytotoxicity, cytoprotection, flavonoids, hydrogen peroxide.

Lista de Figuras

Figura 1 – Estrutura geral da quercetina e miricetina 19
Figura 2 – Sítios relevantes de produção de ERO e sistemas antioxidantes em um tipo celular genérico. 30
Figura 3 – Mecanismos dos efeitos antioxidantes dos flavonóides. 38
Figura 4 – Extrato aquoso liofilizado. 46
Figura 1a – Atividade antioxidante do extrato aquoso 68
Figura 2a – Atividade antioxidante da quercetina 68
Figura 3a – Atividade antioxidante da miricetina 69
Figura 4a – Integridade de membrana na presença dos extratos aquoso e alcoólico 71
Figura 5a – Integridade de membrana na presença dos compostos quercetina e miricetina 72
Figura 6a – Efeito da quercetina sobre a proliferação celular 72
Figura 7a – Efeito dos extratos aquoso e alcoólico sobre a secreção de insulina 73
Figura 8a – Efeito da quercetina e miricetina sobre a secreção de insulina 73
Figura 1b – Atividade citoprotetora após tratamento agudo com os extratos aquoso e alcoólico e quercetina e miricetina 91
Figura 2b – Atividade citoprotetora após tratamento crônico com os extratos aquoso e alcoólico e quercetina e miricetina. 92
Figura 3b – Efeito do tratamento agudo com o extrato aquoso sobre a morfologia celular 97
Figura 4b – Efeito do tratamento agudo com quercetina e miricetina sobre a morfologia celular 97
Figura 5b – Efeito do tratamento crônico com os extratos aquoso e alcoólco sobre a morfologia celular 98
Figura 6b – Efeito do tratamento crônico com a quercetina sobre a morfologia celular 98
Figura 7b – Concentração protéica da superóxido dismutase no tratamento crônico com os extratos aquoso e alcoólico 99
Figura 8b – Concentração protéica da Bax no tratamento crônico com os extratos aquoso e alcoólico. 100
Figura 9b – Concentração protéica das proteínas reguladas por glicose [GRP94 (A) e GRP78 (B)] e a dissulfito isomerase [PDI (C)] no tratamento crônico com os extratos aquoso e alcoólico 102

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Exemplos de espécies reativas radicalares e não-radicalares. 26
Tabela 2 – Flavonóides: classificação, exemplos e fontes alimentares. 37
Tabela 3 – Grupos avaliados quanto à secreção de insulina. 54
Tabela 1a – Citotoxicidade dos extratos aquoso e alcoólico 70
Tabela 2a – Citotoxicidade da quercetina e miricetina. 70

Sumário

1 INTRODUÇÃO 14

USO DE PLANTAS MEDICINAIS 14

EUGENIA UNIFLORA L. 16

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PITANGA 17

EFEITOS TERAPÊUTICOS DE *EUGENIA UNIFLORA* L. 19

DIABETES MELLITUS 21

DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO 25

DIABETES E DEFESA ANTIOXIDANTE 30

1.1.1 Mecanismo enzimático de defesa antioxidante 31

1.1.2 Mecanismo não-enzimático de defesa antioxidante 33

ANTIOXIDANTES E DIETA 34

DIABETES E FLAVONÓIDES 40

2 OBJETIVOS 43

OBJETIVO GERAL 43

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 43

3 MATERIAL E MÉTODOS 45

MATERIAL BIOLÓGICO 45

3.1.1 Cultura de células 45

3.1.2 Preparação do extrato vegetal 45

3.1.2.1 Extrato Aquoso 45

3.1.2.2 Extrato Alcoólico 46

REAGENTES 46

METODOLOGIAS 47

3.1.3 Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos do extrato 47

3.1.4 Determinação da atividade antioxidante (DPPH) 47

3.1.5 Avaliação da viabilidade celular (MTT) 48

3.1.5.1 Citotoxicidade dos Extratos e Compostos Isolados 49

3.1.5.2 Citoproteção dos Extratos e Compostos Isolados em Exposição Aguda e Crônica 50

3.1.6 Avaliação da integridade de membrana (azul de Tripan) 50

3.1.7 Avaliação da morfologia celular 51

3.1.7.1 Morfologia Celular na Exposição Crônica 52

3.1.7.2 Morfologia Celular na Exposição Aguda 53

3.1.8 Determinação da secreção estática de insulina (Curva Dose-Resposta) *53*

3.1.9 Avaliação da expressão protéica por Western Blot *55*

3.1.10 Análise estatística *57*

4 RESULTADOS **58**

CAPÍTULO I **58**

AÇÃO CITOTÓXICA DE EXTRATOS BRUTOS DE *EUGENIA UNIFLORA* L. E DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS E EFEITO SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA 58

CAPÍTULO II **58**

ATIVIDADE CITOPROTETORA DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS DE *EUGENIA UNIFLORA* L. E COMPOSTOS ISOLADOS EM CÉLULAS RINM5F SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR H_2O_2. . 58

5 DISCUSSÃO GERAL **104**

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **115**

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **116**

1 Introdução

Uso de plantas medicinais

Muitas comunidades e grupos étnicos utilizam o conhecimento empírico sobre plantas medicinais como o único recurso terapêutico. Grande parte da população mundial, principalmente aqueles de países em desenvolvimento, usam extratos vegetais de diversas porções de plantas como medicamento (GALHIANE et al., 2006).

Os relatos da medicina popular costumam servir de referência na identificação e investigação de espécies com potencial terapêutico. As farmacopéias tradicionais foram elaboradas por experimentação do conhecimento e o interesse pela fitoterapia aumentou com as recentes tendências globais preocupadas com a biodiversidade, assim como pelo desenvolvimento sustentável (SIMÕES et al., 2002). Deste modo, a busca pela conservação da biodiversidade e da diversidade cultural do ecossistema revela-se importante.

Muitas plantas são usadas no Brasil na forma de extratos brutos, infusões ou emplastros no tratamento de infecções, entretanto, sem nenhuma comprovação científica de sua eficácia (HOLETZ et al., 2002). Apenas uma pequena porcentagem foi adequadamente estudada quanto a sua atividade farmacológica, muitas vezes sendo utilizada sem ser levado em consideração o risco associado à sua toxicidade. Mesmo sendo a flora brasileira considerada a mais rica do mundo, esta foi ainda pouco analisada por estudos etnofarmacológicos (cerca de 8%), perdendo-se a oportunidade de encontrar alternativas de desenvolvimento de novos medicamentos (LORENZI; MATOS, 2002). Para alguns autores, há mais de 200.000 espécies no Brasil e pelo menos metade pode apresentar alguma propriedade terapêutica; porém muitas substâncias de plantas brasileiras

tem sido patenteadas por empresas estrangeiras ou órgãos governamentais (SATO, 2000).

Os primeiros estudos com plantas potencialmente terapêuticas foram desenvolvidos com seus óleos essenciais. Vários destes estudos foram realizados com espécies medicinais brasileiras e comprovaram os efeitos relatados pela medicina popular. Entre eles destacam-se os efeitos analgésico, anti-inflamatório, antibacteriano, antiespasmódico, anticonvulsivante e antifúngico, e o uso nos tratamentos contra pneumonia, diarréia, febre e doenças de pele (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; ALVES et al., 2000; NAKAMURA et al.,1999).

Nas Américas, muitas plantas são popularmente consumidas no controle e combate do diabetes mellitus. Com isso houve um aumento no número de investigações experimentais e clínicas para validar as propriedades antidiabéticas que têm sido empiricamente atribuídas àquelas. Acredita-se que o efeito antidiabético ocorra devido a substâncias antioxidantes presentes nessas plantas. Aliás, os antioxidantes naturais contidos em plantas medicinais e dietéticas são foco de interesse dos pesquisadores por serem candidatos a prevenção do estresse oxidativo (VELÁZQUEZ et al., 2003).

A espécie *Croton cajucara*, vulgarmente conhecida por sacaca (feitiço na língua Tupi) tem suas folhas e cascas do caule utilizadas no combate a diarréia, malária, febre, problemas estomacais, inflamações do fígado, rins, vesícula, no controle de índices elevados de colesterol e, inclusive, diabetes (VAN DEN BERG, 1982; DI STASI et al., 1989; DI STASI, 1994). Cavalcante (1988) comprovou a eficácia hipoglicêmica e hipolipidêmica da sacaca em ratos e, em 1995, Oliveira et al. confirmaram o efeito hipolipidêmico desta em coelhos. *Momordica Charantia*, muito utilizada na Índia, tem suas folhas, frutos e raízes recomendadas para o tratamento de diabetes mellitus (WARIER, 1995). A atividade hipoglicemiante do extrato da fruta foi confirmada

por Gupta e Seth (1962), Leatherdale et al. (1981) e Raman e Lau (1996) em ensaios *in vivo*. As sementes de *Eugenia jambolana* Lam., conhecida como jambolão, também são empregadas no tratamento do diabetes, além de possuir outras propriedades medicinais descritas, como por exemplo, ação adstringente, diurética e digestiva (NADKARNI, 1992).

Contudo, algumas vezes os estudos com plantas comumente utilizadas em tratamento alternativo para diversas enfermidades não validam as propriedades atribuídas àquelas. Como exemplo, um estudo realizado com a polpa da fruta do jambolão, em ensaio com ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, não apresentou melhoras nas alterações metabólicas causadas pelo diabetes (PEPATO et al., 2005). Outro exemplo é a espécie popularmente conhecida como "pata de vaca" (*Bauhinia forficate*) em que o extrato aquoso desta testada em ratos diabéticos não apresentou efeito hipoglicemiante (VOLPATO et al., 2008).

***Eugenia uniflora* L.**

A *Eugenia uniflora L.* (pitangueira) foi introduzida na medicina popular pelos Guaranis no século XV (BONGIOLO, 2008). É uma planta pertencente à família Myrtaceae e seus frutos comestíveis são muito conhecidos e apreciados no Brasil.

O gênero *Eugenia*, da ordem Myrtales, classe Magnoliopsida, é composta de mais de 100 gêneros e 3600 espécies de arbustos e árvores verdes ao longo de todo o ano (TYLER, 1999). É uma árvore originária do Brasil e distribuída em toda América do Sul em uma área que vai do México à Argentina e Uruguai e parece ser bem distribuída no território brasileiro, sendo mais abundante a partir do sudeste em direção ao sul. Pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do

Sul, sendo de fácil adaptação ao clima do sul do Brasil, ocorrendo com freqüência em solos úmidos (VIZZOTTO, 2006; LORENZI; MATOS, 2002).

Composição química da pitanga

Vários estudos têm sido realizados para comprovar a base farmacológica do uso popular de plantas medicinais. Entre elas encontra-se a *Eugenia uniflora* L. cujos estudos demonstram uma grande variedade de efeitos fitoterápicos.

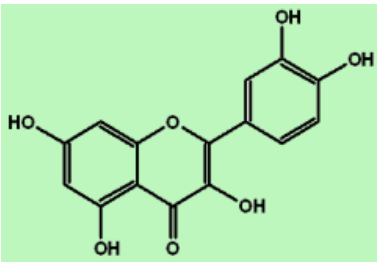
O primeiro componente desta espécie que despertou o interesse dos pesquisadores por sua composição química foi o óleo essencial. Desde 1977 há estudos onde foram isolados vários componentes do óleo essencial de frutos de *E. uniflora*. Encontraram principalmente sesquiterpenos, como furanoelemeno, germacreno, g-elemeno e selina-4(14),7(11)–dieno (RÜCKER et al., 1977). Wyerstahl et al. (1988) descobriram a presença abundante de cariofileno, furanodieno, selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona no óleo essencial proveniente de folhas de *E. uniflora* da Nigéria. Em 1996, Morais et al. isolaram e identificaram alguns componentes do óleo de plantas da região Nordeste do Brasil, onde os componentes majoritários foram selina-1,3,7(11)-trien-8-ona e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-on. Maia et al. (1999) estudaram o óleo essencial de folhas e ramos de *E. uniflora*, colhidos na cidade de Belém, no Pará, tendo sido obtido 1,8% em óleo essencial, do qual germacreno (32,8%), germacreno B (15,6%) e curzereno (30,0%) foram isolados como componentes mais abundantes.

Posteriormente, a partir do estudo de folhas e frutos, vários compostos fitoquímicos, além dos óleos essenciais, foram isolados e investigados. Dentre eles, destacam-se os carotenóides e os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos correspondem a um grande grupo de substâncias que

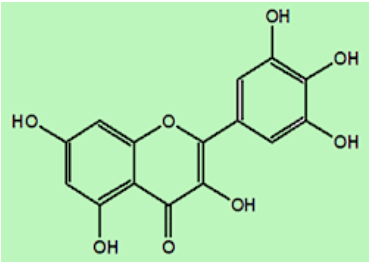
incluem os ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, taninos e flavonóides. Os flavonóides apresentam diversas propriedades descritas, como atividade antioxidante, e alguns dos principais isolados a partir de *E. uniflora* são a miricitrina, miricetina e quercetina (SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987), entretanto diversos autores relatam encontrar em maior quantidade nesta planta, em especial, a quercetina e a miricetina (BANDONI et al., 1972; CONSOLINI; BALDINI; AMAT 1999; CONSOLINI; SARUBBIO, 2002; AURICCHIO, 2007; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 1987).

Os flavonóides são pigmentos naturais de baixo peso molecular, encontrado em vegetais e que se caracterizam por apresentar uma estrutura base C6-C3-C6 (dois anéis fenil – anéis denominados de A e B – ligados através de uma anel central pirano – denominado de anel C). Em geral essas moléculas apresentam caráter anfipático, podendo atuar tanto em meio aquoso quando lipídico (MARTINEZ-FLORES, 2002). A quercetina e a miricetina, em especial, apresentam estruturas químicas semelhantes (Figura 1). Suas estruturas variam apenas no número de hidroxilas, onde a miricetina possui uma hidroxila a mais na posição 5' do anel B, resultando em 3 grupos hidroxilas contínuos nas posições 3', 4' e 5' (CHEN et al., 1996). A atividade antioxidante de um flavonóide é determinada principalmente pelo anel B. De modo geral, quanto maior o número de hidroxilas, maior o potencial como agente doador de H^+ e consequentemente maior a capacidade antioxidante de um flavonóide. Sendo assim, entre os flavonóides, a miricetina se destaca por apresentar elevada capacidade antioxidante seguida pela quercetina. Contudo, apesar de estruturalmente a miricetina apresentar uma ação antioxidante direta maior, a quercetina destaca-se por sua ação indireta, uma vez que é capaz de aumentar a transcrição gênica da glutationa e desta forma aumentar as defesas antioxidantes celulares. Além disso, a quercetina, descrita como um agente antioxidante 5 vezes mais potente que as vitaminas C e E, tem a

capacidade de se associar à vitamina E, e desta forma funcionar como um potente inibidor da peroxidação lipídica e consequentemente como protetor de membranas celulares (MARTINEZ-FLORES, 2002).



Quercetina



Miricetina

Figura 1 – Estrutura geral da Quercetina e Miricetina. Fonte: PHYTOCHEMICALS (2009).

Efeitos terapêuticos de *Eugenia uniflora* L.

Vários efeitos terapêuticos têm sido atribuídos às folhas de *Eugenia uniflora* L. Dentre os principais destacam-se: ação hipotensora, antigota, antirreumática, digestiva e hipoglicemiante. Ainda é popularmente utilizada em distúrbios estomacais, como antipirética, diurética, antitussígena, em doenças hepáticas, como anti-inflamatório, dentre outros efeitos, e como coadjuvante no tratamento médico convencional do diabetes mellitus, mesmo não sendo muitas vezes revelado pelos pacientes aos médicos (ALMEIDA et al., 1995; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1988).

Consolini e Sarubbio (2002) concluíram que as folhas de *E. uniflora* L. possuem atividade cardíaca (ação β-adrenégica através de liberação de catecolamidas e ação bloqueadora de cálcio) que podem produzir efeito terapêutico (hipotensor) e contribuir para efeito cronotrópico (freqüência cardíaca) e inotrópico (força de contração) no coração. Estudos mostraram que além da atividade cardíaca, as folhas de pitanga exibem também atividade vasodilatadora (IC50 de 3mg de

folhas secas/kg) e diurética (120mg de folhas secas/kg) (CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999).

Outro efeito terapêutico atribuído à pitangueira é ação bactericida dos extratos de suas folhas sobre *Staphylococcus aureous* e *Escherichia coli* e frutos sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Providencia spp.*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp*. coagulase (HOLETZ et al., 2002; GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

O uso da pitanga no tratamento contra o diabetes foi inferido por Arai et al. (1999) quando eles confirmaram o efeito hipoglicemiante de frações de pitanga (extrato aquoso de folhas) utilizado por via oral em camundongos. Momose (2000) atribuiu este efeito hipoglicemiante à atividade inibitória do extrato sobre enzimas intestinais, tais como as α – glicosidases: maltase e sucrase. Na mesma linha de pesquisa, Matsumura et al. (2000) confirmaram a presença de componentes do extrato aquoso de folhas secas de *E. uniflora* capazes de inibirem a degradação enzimática de polissacarídeos a monossacarídeos e determinaram a intensidade da inibição das α-glicosidases, tendo obtido IC50 de 120µg/mL para maltase e IC50% de 160µg/mL para sucrase. Além da inibição da digestão de açúcares, também é atribuída aos extratos de pitanga a redução na absorção intestinal de gorduras, o que pode ser eficiente no tratamento do diabetes e obesidade (ARAI et al., 1999). Ao mesmo tempo, identificou-se derivados da pentahidroxiindolizidina às quais são atribuídas propriedades que podem demonstrar a ação da *E. uniflora* como antidiabética. Do fracionamento do extrato aquoso, os autores concluíram que o composto 1,2,5,7,8-pentaidroxindolizidina apresenta atividade inibitória às enzimas maltase e sucrase, exibindo IC50 de 4µg/mL para maltase e 1,8µg/mL para sucrase (MATSUMURA et al., 2000).

Apesar do efeito inibitório sobre a absorção de carboidratos e lipídios, não há estudos relacionando a ação direta da *Eugenia uniflora* L. sobre o pâncreas endócrino, mais especificamente sobre as células secretoras de insulina. Velásquez et al. (2003) verificaram que o extrato de *E. uniflora*, rico em compostos fenólicos, apresenta ação antioxidante protegendo contra peroxidação lipídica enzimática e não enzimática de membranas microssomais de ratos e efeito *scanvenger* de radicais livres, tais como de superóxidos e radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Este fato é bastante significativo, uma vez que, sabidamente, o diabetes mellitus, pelo menos em parte, é desencadeado por estresse oxidativo em células β.

Entre diversas atividades já descritas, Schmeda–Hirschmann et al. (1987) utilizaram várias frações do extrato hidroalcoólico das folhas de pitanga para verificar a atividade da enzima xantina-oxidase, responsável em catalisar a oxidação da hipoxantina e da xantina em ácido úrico e ânions superóxidos. Concluíram que há atividade inibitória desta enzima, portanto uma importante ação antioxidante, e inferiram que grande parte o resultado deve-se aos flavonóides quercetina e miricetina presentes nos extratos de pitanga.

Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Ocorre quando o pâncreas não mais produz insulina, ou ainda, quando há redução ou deficiência da atividade periférica da insulina. O hormônio insulina é responsável por regular os níveis de açúcar sanguíneo. Este atua estimulando a translocação de transportadores de glicose do citoplasma para a membrana celular, possibilitando que a glicose seja transportada para o interior das células, e posteriormente convertida em energia ou armazenada sob a forma de glicogênio. Em condição prolongada de hiperglicemia, comum em casos de diabetes não-

controlados, ocorre sérios danos a muitos sistemas, especialmente aos nervos e aos vasos sanguíneos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevida do paciente diabético (DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007). A organização mundial da saúde estima que há mais de 180 milhões de pessoas com diabetes e que este número deva mais que dobrar até 2030. Além disso, quase 80% das mortes por essa doença ocorrem em países pobres ou em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). O Brasil encontra-se em 6º lugar no mundo em casos de diabetes, com cerca de cinco milhões de brasileiros apresentando a doença. Esta situação é agravada devido às estatísticas mostrarem que 50% das pessoas não sabem que são portadoras de diabetes e 23% conhecem seu diagnóstico, mas não fazem nenhum tipo de tratamento (OLIVEIRA; LUNARDI FILHO, 2004). No Brasil, as cidades das regiões Sul e Sudeste, consideradas de maior desenvolvimento econômico do país, apresentam maiores prevalências do diabetes mellitus e de intolerância à glicose (SARTORELLI; FRANCO, 2003).

O diabetes mellitus pode ser classificado principalmente em dois tipos: diabetes tipo 1 (DM1) e diabetes tipo 2 (DM2).

O diabetes tipo 1 é uma doença auto-imune caracterizada pela destruição das células produtoras de insulina com consequente deficiência deste hormônio. As evidências de processos auto-imunes são os marcadores de auto-imunidade como anticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico e antitirosina-fosfatases, entretanto, há alguns raros casos onde estes processos não são evidenciados. O diabetes tipo 1 representa de 5-10% dos casos e

pode ainda ocorrer por produção de espécies reativas por macrófagos que invadem o tecido pancreático (chamada insulinite) e acabam por participar de reações tóxicas que levam a apoptose ou até mesmo necrose das células produtoras de insulina (MANDRUP POULSEN, 1996; RABINOVITCH et al., 1996; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Outras causas do diabetes tipo 1 incluem toxinas microbianas, agentes químicos ou toxinas presentes na própria dieta. Este tipo de diabetes normalmente se inicia na infância ou adolescência, períodos nos quais a taxa de destruição das células β é maior.

O diabetes tipo 2, que acomete pelo menos 90% das pessoas com diabetes no mundo, começa normalmente a partir dos 40 anos. O aumento da prevalência desta doença está relacionado com o crescente aumento na taxa de sobrepeso e obesidade; visto que quanto maior for o percentual de gordura corporal, maior é a tendência à resistência à ação da insulina e a chance do indivíduo desenvolver diabetes (SARTORELLI; FRANCO, 2003; ADA, 2000).

Este tipo de diabetes ocorre por defeitos na ação e/ou na secreção da insulina (BELL; POLONSKY, 2001; KAHN, 2003; NEWSHOLME et al., 2007). Por muitas razões, as células não conseguem metabolizar efetivamente a glicose presente na corrente sanguínea. Esta é uma anomalia chamada de "resistência insulínica". Essa resistência é comum nos órgãos e tecidos com alta taxa metabólica incluindo músculo, tecido adiposo e fígado (NEWSHOLME et al., 2007). Em geral os defeitos na ação e/ou secreção de insulina estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver o predomínio de um deles. Esta resistência caracteriza-se por uma diminuição na resposta dos receptores de insulina presentes no tecido periférico. Devido a ela, as células β do pâncreas aumentam a produção de insulina que, ao longo dos anos, acaba por levar as células à exaustão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Quando há resistência à

insulina, ocorre a elevação de glicose e de ácidos graxos circulantes, o que acarreta em um aumento do estresse oxidativo nas células e tecidos expostos a estas alterações metabólicas (EVANS et al., 2003; KANETO et al., 2006; NEWSHOLME et al., 2007). A glicose e os ácidos graxos têm um efeito sinergético em células β-pancreáticas. Depois de exposição aguda, ambos estimulam a secreção de insulina. Em contraste, depois de exposição prolongada (crônica), ambos causam danos funcionais nestas células ou induzem estas à morte (RACHEK et al. 2006; NEWSHOLME et al. 2007).

O papel da hiperglicemia nas complicações tardias do diabetes, tais como retinopatia, nefropatia, dislipidemia e neuropatia, não está muito claro, entretanto existem hipóteses sobre a participação da proteína glicada nestas complicações. O elevado nível de glicose sanguíneo promove a glicosilação de proteínas por reações de Maillard, o que consequentemente produz bases de Schiff, produtos de Amadori e produtos finais de glicosilação (AGEs) (KIYOKO et al., 2003). Os AGEs induzem a formação de espécies reativas que se acumulam durante o processo normal do envelhecimento, porém esse acúmulo é acelerado devido ao diabetes e a outras doenças crônicas como artrite, arteriosclerose e cirrose hepática (LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2005; YAGMUR et al., 2006). Em virtude disso, a suplementação da dieta com antioxidantes tem diminuído as complicações causadas por diabetes em pacientes e em modelos animais (ROBERTSON et al., 2003).

Com todas as atuais evidências experimentais, é amplamente aceito que espécies reativas radicalares e não-radicalares contribuam para os danos e disfunções teciduais causados pela glicotoxicidade e lipotoxicidade características do diabetes. Essas espécies reagem causando danos celulares através de modificações não-específicas e alterações de proteínas, ácidos nucléicos e fosfolipídeos. Sob condições de metabolismo ou atividade mitocondrial elevadas, muitas células de

tecido especializado são alvo para as espécies reativas. Um melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pela geração destas e sua reatividade podem resultar em novas estratégias de intervenção tendendo para redução dos danos associados com o estresse oxidativo (NEWSHOLME et al., 2007).

Diabetes e Estresse Oxidativo

Definem-se *radicais livres* como *espécies reativas* independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados. A presença de elétrons desemparelhados no átomo ou na molécula aumenta a sua reatividade química. Isto lhes confere grande instabilidade, por tenderem a acoplar o elétron não pareado com um outro que esteja presente em estruturas próximas à sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (LEITE; SARNI, 2003).

Durante o metabolismo celular aeróbico, normalmente são produzidas uma série de substâncias eletricamente instáveis (espécies reativas radicalares ou não-radicalares), potencialmente reativas com biomoléculas (lipídios, proteínas, ácido nucléico, etc), que por sua vez, produzem reações em cadeia caracterizadas pela geração de novos radicais livres e espécies reativas não-radicalares que podem reagir com outras biomoléculas, podendo resultar em danos irreversíveis à célula. Na tabela 1 estão listados alguns dos principais exemplos de radicais livres e espécies reativas não-radicalares.

Tabela 1 – Exemplos de espécies reativas radicalares (radicais livres) e não-radicalares.

1. RADICAIS LIVRES	
a. Espécies reativas de oxigênio radicalares	
O_2	oxigênio molecular
$OH^{\bullet}$	hidroxil
$O_2^{\bullet -}$	superóxido
$HO_2^{\bullet -}$	peridroxil
b. Outros exemplos de radicais livres	
$RO^{\bullet}$	alcoxil
$NO^{\bullet}$	óxido nítrico
$RO_2^{\bullet}$	peroxil
2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NÃO-RADICALARES	
O_2	oxigênio singlete
O_3	ozônio
$ONOO^-$	peroxinitrito
H_2O_2	peróxido de hidrogênio

O processo evolucionário permitiu aos organismos aeróbios desenvolverem mecanismos muito bem balanceados de defesa para promover a neutralização dos efeitos oxidativos dessas moléculas e de seus metabólitos reativos, denominado de sistemas antioxidantes (KATOCH; BEGUM, 2003). Isso porque a oxidação de macromoléculas causada por espécies reativas, inclusive as derivadas de oxigênio, altera a fisiologia normal da célula, podendo eventualmente comprometer a funcionalidade destas. Aqui se caracteriza o paradoxo da vida, em que a própria molécula que sustenta a vida aeróbia (oxigênio) por ser essencial para o metabolismo energético e respiração também está relacionada com o comprometimento da funcionalidade celular (MARX, 1985; FRIDOVICH, 1983; HALLIWELL, 1997). Em estado de homeostasia, as espécies reativas atuam como intermediários de reações de oxidação-redução essenciais para a vida, exercendo um importante papel nos processos homeostáticos. Porém, quando há acúmulo, seja por superprodução ou deficiência nas defesas intracelulares, elas podem causar alterações em estruturas biológicas modificando o metabolismo celular, evento denominado de estresse oxidativo (LEITE; SARNI, 2003; SIES, 1993; KIM; OKAMOTO; YOKOZAWA, 2009).

Em processos fisiológicos normais, as espécies reativas interferem em vias de sinalização intracelular relacionadas com apoptose, processos inflamatórios e expressão gênica através da ativação de fatores de transcrição. Participam ainda da defesa celular, através da destruição de micro-organismos durante o processo de fagocitose. Porém, esse processo passa a ser prejudicial quando a inflamação se torna sistêmica, como na sepse, em que a perda de controle da produção de espécies reativas pode causar lesão à distância. Além disso, nas doenças inflamatórias crônicas esta produção torna-se excessiva, provocando lesões teciduais (LEITE; SARNI, 2003).

A produção normal de espécies reativas no metabolismo celular *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons decorrentes do metabolismo celular, como a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, ou pela exposição a fatores exógenos (KATOCH; BEGUM, 2003). Exemplos de fatores endógenos geradores dessas moléculas são inflamações, respiração aeróbia, peroxissomos e enzimas do complexo citocromo P450 e NADPH oxidase. Exemplos de fatores exógenos são moléculas de ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Dentre as principais espécies reativas, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO). A cadeia transportadora de elétrons é a maior fonte celular de espécies reativas de oxigênio, produzindo ânion superóxido que é subsequentemente convertido em peróxido de hidrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Há ainda um mecanismo independente responsável pela geração de ERO em diversos grupos celulares, ente eles, as células β-pancreáticas. Este mecanismo envolve a ativação de uma enzima de membrana conhecida como NADPH oxidase, que consiste em um complexo enzimático formado pelo agrupamento de diferentes componentes citoplasmáticos e de membrana associados que pode contribuir com o estresse oxidativo,

produzindo grandes quantidades de ânions superóxido (NEWSHOLME et al., 2007).

As espécies reativas de oxigênio são tidas como mediadoras de morte celular, já que altos níveis de estresse oxidativo podem causar necrose e baixos níveis deste funcionam como desencadeador de mecanismos de apoptose, processo importante em mecanismos fisiológicos (DYPBUKT et al., 1994). Em nível sistêmico, os danos causados por ERO estão relacionados a condições de inflamação, degeneração pela idade, formação de tumores e diabetes mellitus (BROWNLEE, 2005; GREENMAN et al., 2007).

As principais ERO formadas são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que apresenta uma baixa capacidade de oxidação; o radical hidroxila (OH^-), que possui uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas e atua ainda como precursor de outras espécies reativas (LEITE; SARNI, 2003; ANDERSON, 1996).

O H_2O_2 e o $O_2^{\bullet -}$, por causarem lesões celulares ao atacarem os ácidos graxos das membranas celulares, são considerados extremamente tóxicos. Sua toxicidade deve-se principalmente à conversão dessas moléculas em radical hidroxila (OH^-), o que caracteriza a reação de Fenton (LEITE; SARNI, 2003; BONDAN, 2006). O OH^- é altamente lesivo, pois causa quebra e modificações nas bases de DNA, o que leva a alterações na expressão gênica, mutação e apoptose, alterações de cadeias protéicas e peroxidação lipídica com consequente prejuízo do transporte intercelular (LEITE; SARNI, 2003). Além disso, ele pode inativar várias proteínas ao oxidar seus grupamentos sulfidrílicos (-SH) e as pontes dissulfeto (-SS) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Em ensaios *in vitro*, o H_2O_2 é um modelo bem estabelecido de indutor de estresse oxidativo por ser uma molécula de oxigênio intermediária no metabolismo celular e por apresentar alta reatividade (TANG; ZHANG, 2000). Além disso, representa um agente fisiológico presente na maioria dos processos oxidativos independente da causa inicial da oxidação. Lennon, Martin e Cotter (1991) e Sah et al. (1999) afirmaram que exposição de sistemas a baixas doses de H_2O_2 induz apoptose em uma variedade de tipos celulares. Estudos realizados por Fu-Liang et al. (2005) mostraram que doses de 500μM de H_2O_2 aumentaram significativamente a quantidade de ERO resultando em danos às células pancreáticas e redução na secreção de insulina dependente de glicose.

Neste sentido, o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e de defesa antioxidante (estresse oxidativo) é um estágio inicial na patologia do diabetes e pode contribuir para o desenvolvimento de complicações características desta doença (NOUROOZ-ZADEH et al., 1997). Sendo assim, as investigações da fisiopatologia das complicações secundárias estão focadas no início e progresso do estresse oxidativo.

As células produtoras de insulina são particularmente susceptíveis a ação de espécies reativas devido à baixa expressão e atividade das enzimas antioxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996; TIEDGE et al., 1997). Portanto, o alto risco de danos pode ocorrer devido à produção excessiva de espécies reativas mitocondriais, por aumento na produção de ERO derivados da elevada atividade da enzima NAPH oxidase e/ou por falhas na defesa antioxidante nestas células (NEWSHOLME et al., 2007), conforme observado na figura abaixo (Figura 2).

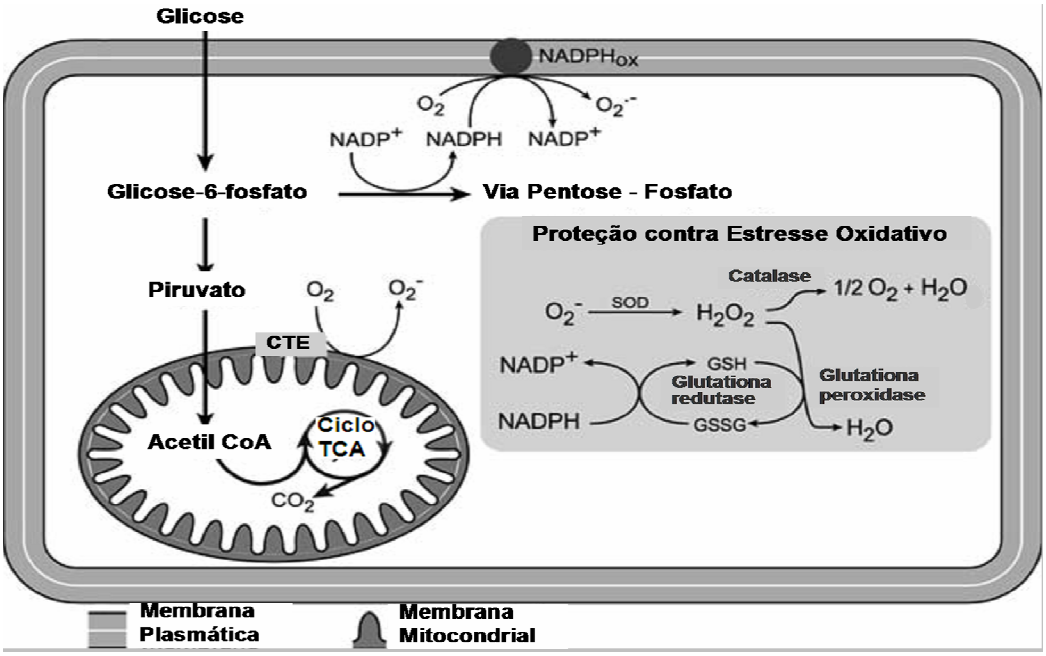


Figura 2 – Sítios relevantes de produção de ERO e sistemas antioxidantes em um tipo celular genérico. ERO podem ser gerados pelo metabolismo de glicose na mitocôndria (pela atividade da cadeia transportadora de elétrons - CTE) e na membrana plasmática (pela NADPH oxidase – NADPHox), principalmente. Os principais sistemas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase, glutationa peroxidase e catalase. Adaptado: NEWSHOLME et al. (2007).

Diabetes e Defesa Antioxidante

Durante o metabolismo celular normal existem vários mecanismos envolvidos na produção de espécies reativas. Contudo, as células possuem mecanismos de defesa antioxidante para limitar seus níveis intracelulares e impedir a indução de danos e comprometimento da funcionalidade celular.

Neste sentido, antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações se comparadas com as de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste de maneira eficaz; ou ainda, são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelas espécies reativas nas células (SIES; STAHL, 1995; BONDAN, 2006). Esta

definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática.

As indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também a de medicamentos utilizam-se de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos como mecanismos de defesa contra as espécies reativas. Entretanto, diversas vezes são os próprios medicamentos que aumentam a geração intracelular dessas espécies (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL et al., 1995; WEIJL et al., 1997).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro nível é impedir a formação das espécies reativas, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. O próximo é interceptar as espécies reativas impedindo o ataque sobre os lipídeos e os aminoácidos, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Outro mecanismo de proteção celular é o reparo das lesões. Esse processo está relacionado com a remoção dos danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. E em algumas situações, quando as células estão sob estresse oxidativo, enzimas antioxidantes são produzidas como resposta adaptativa contra esses agentes altamente reativos (SIES, 1993; BIANCHI; ANTUNES, 1999; LAYBUTT et al., 2002).

1.1.1 Mecanismo enzimático de defesa antioxidante

Este mecanismo celular é composto principalmente por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPX), conforme representado na figura 2. A ação destas é dependente de metais de transição que são cofatores localizados nos seus sítios catalíticos. A SOD citoplasmática, por exemplo, necessita de cobre e zinco para agir e a SOD mitocondrial, de manganês; enquanto a CAT é depende de ferro e a GPX necessita de selênio (LEITE; SARNI, 2003;

BONDAN, 2006; OLIVEIRA, 2003).

A SOD desempenha o papel de catalisar a conversão de radicais superóxido em H_2O_2. Estes são posteriormente convertidos em água e molécula de oxigênio pela CAT e GPX (LAYBUTT et al., 2002). A CAT e a GPX são os principais varredores enzimáticos de espécies reativas, convertendo o H_2O_2 em oxigênio molecular e água. Estão presentes em teores elevados nos eritrócitos e hepatócitos e moderados nos pulmões e no coração (LEITE; SARNI, 2003).

A atividade da CAT está localizada em grande quantidade nos peroxissomos. Uma pequena concentração de CAT pode ser encontrada, também, na mitocôndria (fígado), nos cloroplastos e no retículo endoplasmático (BONDAN, 2006).

A GPX necessita da glutationa reduzida (GSH - tiol não protéico mais abundante nas células de mamíferos) para poder atuar. A glutationa oxidada (GSSG), resultante da reação catalisada pela GPX, é reduzida a GSH pela enzima glutationa redutase (GRd) que utiliza NADPH para catalisar a reação. A maior parte da glutationa livre intracelular *in vivo* está na forma reduzida (GSH) e não na forma oxidada (GSSG) (BONDAN, 2006). A GSH distribui-se nas membranas lipídicas, sendo, portanto, muito bem localizada para exercer a máxima atividade antioxidante. É substrato para as enzimas antioxidantes: GSH transferases e peroxidases. GSH, além de regeneração enzimática, pode ser regenerada por mecanismos não-enzimáticos, como por meio de ascorbato (LEITE; SARNI, 2003).

1.1.2 Mecanismo não-enzimático de defesa antioxidante

Dentre os principais antioxidantes não-enzimáticos incluem-se os lipossolúveis, tais como, as bioflavonas, vitamina A e vitamina E e os hidrossolúveis, como a vitamina C, B6 e catecóis (BONDAN, 2006).

A vitamina E ou α-tocoferol tem efeito modulador sobre as respostas inflamatória e imune. Em geral sua deficiência aumenta os componentes da resposta inflamatória e prejudica a imunidade celular e humoral. A vitamina E atua como a principal defesa contra a lesão oxidativa das membranas celulares (LEITE; SARNI, 2003).

A vitamina C, atua eliminando diretamente as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e está envolvida na reciclagem de α-tocoferil em α-tocoferol (BONDAN, 2006). O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998).

A vitamina B6 não é considerada um antioxidante direto, porém está envolvida na defesa antioxidante por participar das reações metabólicas envolvidas na formação de cisteína, precursora da síntese de GSH. Tem efeito benéfico sobre o sistema imune por aumentar a proliferação linfocitária e em caso de deficiência, rara em humanos, limita a síntese de cisteína e GSH (LEITE; SARNI, 2003).

Outros antioxidantes, como os bioflavonóides têm potente efeito antioxidante, principalmente sobre os radicais superóxidos. Os flavonóides do vinho tinto, por exemplo, são considerados possíveis responsáveis pela proteção conferida contra a doença isquêmica do coração

(LEITE; SARNI, 2003). Além disso, estudos recentes têm mostrado que muitos flavonóides são melhores antioxidantes que vitaminas (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005).

Neste sentido, vale a pena destacar que o desempenho de antioxidantes depende de fatores como: tipo de espécies reativas formadas, onde e como elas são geradas; análise e métodos para a identificação dos danos e principalmente doses ideais para obter proteção, pois é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema e que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas / tecidos (HALLIWELL et al., 1995).

Antioxidantes e Dieta

Os sistemas antioxidantes não são 100% eficientes. Os danos causados às biomoléculas pelas espécies reativas podem alterar funções celulares e levar as células à morte celular. Sendo assim, compreender o papel que o estresse oxidativo desempenha no desenvolvimento de doenças fez a pesquisa por antioxidantes mais importante. Além disso, nos últimos anos houve um aumento significativo na busca por substâncias antioxidantes naturais. Grandes centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas têm buscado na natureza uma alternativa aos antioxidantes sintéticos, uma vez que o uso destes tem se tornado cada vez mais restrito por apresentarem certa toxicidade (GORDON, 1996).

A atividade antioxidante apresentada por vários vegetais em suas partes constituintes como frutos, folhas e sementes, muitas das quais são utilizadas como alimentos, está correlacionada ao seu teor de compostos como cafeína, aminas, alcalóides, ligninas, terpenos oxidados, taninos e fenóis (LARSON, 1988; COTELLE, 1996; OKADA; KANEKO; OKAJIMA, 1996). Esta variedade de substâncias que pode atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos, sendo

capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelas espécies reativas (STAVRIC, 1994; FOTSIS et al., 1997; POOL-ZOBEL et al., 1997).

Dentre os compostos com propriedade antioxidante, os compostos fenólicos são produtos do metabolismo secundário de plantas e estão onipresentes nos órgãos de todas elas, com distribuição desigual (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Os polifenóis naturais podem abranger desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, como os taninos. Eles se associam com outros compostos como os carboidratos (glicose), ácidos orgânicos, aminas, lipídeos ou mesmo outros fenóis e fornecem boa parte do sabor e cor das frutas, flores e folhas. Este grupo é encontrado em vários alimentos consumidos na dieta como, hortaliças, leguminosas, cereais, frutas, nozes, chocolates, milho, canela e bebidas como vinho, cerveja, chás, sidras, dentre outros (D´ARCHIVIO et al., 2007). Devido a sua característica antioxidante, essas substâncias protegem contra peroxidação lipídica e danos causados por U.V. que podem afetar o desenvolvimento de frutas de espécies tropicais expostas a condições severas de intensidade luminosa (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005).

As propriedades biológicas dos polifenóis dependem da sua biodisponibilidade. Sua absorção através da barreira intestinal vem sendo observada através do aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de alimentos ricos em polifenóis (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Entretanto, a disponibilidade difere grandemente entre os polifenóis, não correspondendo necessariamente aqueles de maior abundância como sendo os mais biodisponíveis (D´ARCHIVIO et al., 2007). Os polifenóis aparecem no plasma sanguíneo em níveis farmacologicamente ativos após ingestão de alimentos ricos nesses compostos, contudo, não se acumulam no organismo (CAO et al., 1998, HOLLMAN; KATAN, 1999).

Dentre o grande grupo de compostos fenólicos inclui-se os flavonóides que englobam ainda as antocianinas, flavonas, flavanonas, isoflavonóides, flavanóis e flavonóis. Os flavonóides mais investigados são: a quercetina, a miricetina, a rutina e a naringenina, sendo que muitos destes foram encontrados em extratos foliares (HARTMAN; SHANKEL, 1990; REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005). Eles têm sido amplamente estudados devido à redução do risco ou retardo do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e modulação de outros processos biológicos essenciais em mamíferos (COENTRÃO, 2005). Do mesmo modo, apresentam propriedade anti-inflamatória, antialergênica, antiviral, antifúngica, anti-hemorrágica, anti-plaquetária e vasodilatadora (KIM et al., 2007a; FORMICA; REGELSON 1995; SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1996; AKHLAGHI; BANDY, 2009). Eles ainda inibem diversas enzimas, incluindo aldose redutase, α–glicosidase, xantina oxidase, mono-oxigenase, lipo-oxigenase e ciclo-oxigenase (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1993; YOSHIKAWA et al., 1998).

Tabela 2 – Flavonóides: classificação, exemplos e fontes alimentares.

CLASSE	EXEMPLOS	FONTE ALIMENTOS
Flavonóis	quercetina miricetina kaempferol galangina	cebola alho tomate cereja espinafre amora
Flavanonas	naringenina eriodictiol hesperidina	laranja toranja limão hortelã
Flavonas	apigenina crisina luteolina	aipo salsa pimenta azeitona
Antocianidinas	pelargonidina peonidina malvidina europinidina apigeninidina luteolinidina	berinjela passas pretas uvas pretas morango ameixa
Isoflavonas	genisteína daidzeína gliciteína formononetina	soja produtos de soja tofu
Flavanóis	catequina epicatequina epigalocatequina epigatequina galato epigalocatequina galato	chás chocolate vinho tinto maça pêssego uva

Os compostos fenólicos contêm grupos hidroxila que lhes conferem ação antioxidante com potencial terapêutico. Isso lhes permite prevenir danos causados por espécies reativas de várias formas. Possuem ação direta, uma vez que são capazes de sequestrar as espécies reativas, atuando

como *scavenger* em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Devido a grande reatividade do grupo hidroxil, são oxidados pelas espécies reativas resultando em uma molécula mais estável e menos reativa (NIJVELDT et al., 2001; REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005).

Outro mecanismo possível pelo qual os flavonóides atuam é na prevenção da produção de oxidantes como, por exemplo, pela inibição da xantina oxidase e por quelar metais de transição. Ainda bloqueiam a propagação de reações oxidativas e reforçam a capacidade antioxidante celular por poupar outros antioxidantes intracelulares e induzir a expressão de antioxidantes endógenos (Figura 3) (AKHLAGHI; BANDY, 2009).

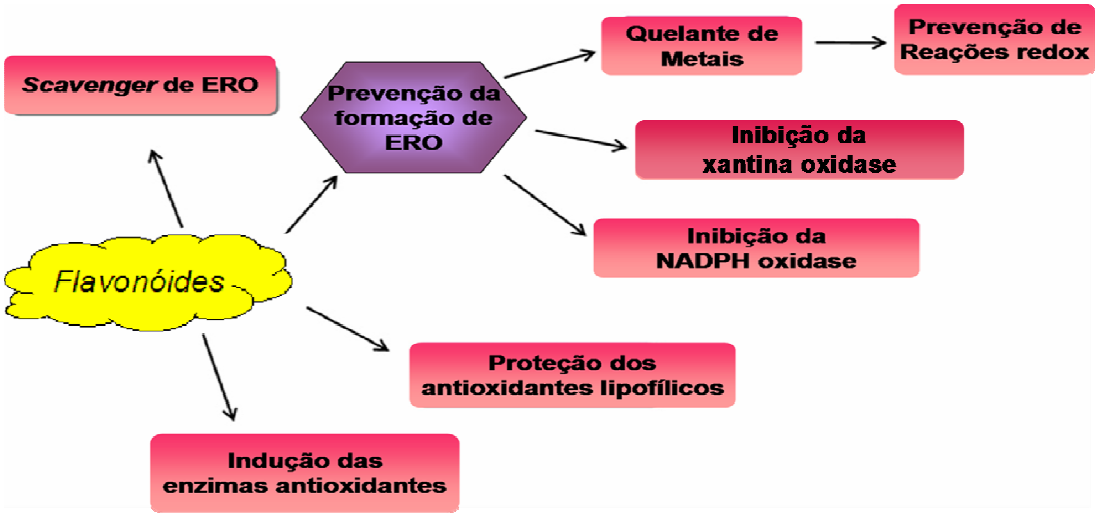


Figura 3 – Mecanismos dos efeitos antioxidantes dos flavonóides. Flavonóides podem prevenir geração de ERO, atuar como *scanvenger* de ERO ou melhorar indiretamente a atividade dos antioxidantes celulares. Fonte: AKHLAGHI; BANDY (2009).

Vários flavonóides reduzem os danos causados por isquemia-reperfusão por interferirem na atividade da óxido-nítrico sintetase (SHOSKES, 1998). Há relatos do efeito inibitório da apigenina, luotenina e quercetina na produção de óxido nítrico de uma linhagem celular (RAW 264) de macrófagos ativados por lipopolissacarídeos. Além disso, muitos flavonóides, como a quercetina, apigenina e luteolina, inibem a ativação do fator nuclear *κappa* B (NF–κB) dependente de

citocinas, óxido nítrico sintetase (iNOS) e ciclo-oxigenase 2. Kim et al. (2005), Martinez-Florez et al. (2005) e Ruiz e Haller (2006) demonstraram a inibição da ativação do NF-κB em hepatócitos, macrófagos e células epiteliais intestinais. A quercetina, em particular, inibe a atividade da ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, diminuindo a formação de metabólitos inflamatórios, como o ácido araquidônico (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1996; KIM et al., 1998).

A quercetina é responsável pela depuração de ânions superóxidos e radicais hidroxilas (SOARES, 2002; MILTERSTEINER et al., 2003;). Junto com a vitamina C, esta demonstrou efeitos sinérgicos na função antioxidante acarretando em citoproteção. O ácido ascórbico age como um redutor da oxidação da quercetina, de maneira que combinados, a vitamina C permite uma estabilidade maior do flavonóide para cumprir suas funções antioxidativas. Por outro lado, a quercetina protege a vitamina E da oxidação, com a qual também apresenta efeitos sinérgicos (MUNIZ, 2007). Inclusive, relatou-se que os flavonóides miricetina, quercetina e rutina foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo H_2O_2 no DNA de linfócitos humanos (NOROOZI; ANGERSON; LEAN, 1998). Segundo Murota e Terao (2003), a quercetina apresenta ainda uma atividade *SOD-like*, em que esta é capaz de neutralizar o radical superóxido, convertendo este em peróxido de hidrogênio.

A quercetina e miricetina demonstraram inibir *in vitro* a glicação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), presente no diabetes, potencializando assim a redução da oxidação da LDL e a citotoxicidade da LDL oxidada. Desta forma estes compostos apresentam importante papel em atenuar o risco aterosclerótico em indivíduos diabéticos (GHAFFARI; MOJAB, 2007). Este fator e sua propriedade antioxidante associa a quercetina à redução do risco de morte por doenças e danos cardíacos. Neste sentido, a quercetina demonstrou diminuir a incidência de infarto do miocárdio e

acidente vascular cerebral em pessoas da terceira idade (PLANTAS MEDICINALES, 2009).

Embora compostos fenólicos tipicamente atuem como antioxidantes, com propriedade citoprotetora, em determinadas condições podem agir como pró-oxidantes e citotóxicos. Desta forma, muitos dos dados mostrados na literatura podem ser divididos em 2 grupos: efeito citoprotetor dos compostos fenólicos contra várias formas de estresse oxidativo e, dados mostrando, principalmente com células tumorais, efeito antiproliferativo e de indução de morte celular (EBERHARDT; LEE; LIU, 2000; ELATTAR; VIRJI, 1999). Lapidot, Walker e Kanner (2002) descrevem que o comportamento dos flavonóides ou ácidos fenólicos como antioxidante ou pró-oxidante depende da natureza do estresse oxidativo. Além disso, estudos afirmam que o flavonól mais estudado (quercetina) pode ser convertido, *in vitro*, quando na presença de íons metálicos como ferro e cobre, em metabólitos citotóxicos (METODIEWA et al., 1999).

Diabetes e Flavonóides

O uso de moléculas antioxidantes em pacientes diabéticos e em modelos animais tem se mostrado importante na redução do estresse oxidativo em células pancreáticas. Além disso, vários extratos e compostos isolados de plantas atuam no processo de ativação de enzimas antioxidantes tendo ação contra o diabetes.

Neste sentido, catequinas, presentes no chá verde, exercem efeito protetor por acarretarem na redução dos marcadores de estresse oxidativo (peróxidos e 8-hidroxideoxiguanosina), observado em experimentos com hamsters (TAKABAYASHI et al., 1997). Kim et al. (2003) descreveram que a epicatequina de chá verde, administrada em ratos na dose de 30mg/Kg, duas vezes ao dia, por 6 dias, os protegeu contra a hiperglicemia que havia sido induzida por

estreptozotocina, mantendo a morfologia normal do pâncreas e aumentando a liberação de insulina, concomitantemente com a redução na produção de nitritos. Além disso, procianidinas de sementes de uva são eficientes na prevenção da hiperglicemia e hipoinsulinemia em ratos diabéticos induzidos por aloxana (EL-ALFY; AHMED; FATANI, 2005). Silimarina parece induzir o pâncreas à recuperação contra o diabetes induzido por aloxana quando administrado concomitante e posteriormente à administração da aloxana. Soto et al. (2004) comprovaram este fato quando observaram não somente a morfologia tecidual normal, mas também a inibição da redução sérica dos níveis de insulina. Ainda, a rutina, forma glicosídica da quercetina, inibiu o decaimento dos níveis da insulina plasmática em ratos diabéticos, enquanto não teve efeito em ratos normais quando administrada 100mg/Kg por 45 dias (STANLEY e KAMALAKKANNAN, 2006).

Um estudo prospectivo mostrou que a ingestão de alguns tipos específicos de flavonóides, incluindo quercetina e miricetina está inversamente associada ao risco de incidência do diabetes tipo 2 (KNEKT et al., 2002). A partir disso, Song et al. (2005) sugerem que os flavonóides podem atuar preservando as funções das células β– pancreáticas por redução de danos em tecido induzido pelo estresse oxidativo. No estudo de Coskun et al. (2005), quercetina foi injetada intraperitonealmente 3 dias antes da indução de diabetes por estreptozotocina. A redução do nível de insulina plasmática e o aumento do nível de glicose foram parcialmente prevenidos pelo tratamento com quercetina. Além disso, a análise imunohistoquímica realizada por Dias et al. (2005) mostrou redução na degradação das células β e uma diminuição dos marcadores de estresse oxidativo com inibição da ativação do fator NF-κB e redução da expressão de iNOS em ratos diabéticos. Autores relatam que a introdução de quercetina na dieta de ratos diabéticos melhora esta condição em torno do 25% (SHETTY et al., 2004). A citoproteção da quercetina, apigenina e luotenina são comparáveis com as do inibidor de produção de NOS, denominado L-Name e foram observadas pela preservação da capacidade

secretora de insulina estimulada por glicose (KIM et al., 2007a).

Ong e Khoo (2000) sugerem que a miricetina apresenta potencial terapêutico no tratamento do diabetes após realizarem experimento em ratos diabéticos utilizando miricetina na dose de 3mg/kg, com aplicações a cada 12 horas. No estudo demonstraram que a hiperglicemia foi reduzida em 50% em relação ao controle. Também foi evidenciada a redução da hipertrigliceridemia até os parâmetros normais. Há ainda a descrição desses efeitos da miricetina sobre a resistência à insulina em ratos alimentados por seis semanas com dieta contendo 60% de frutose. Os animais receberam injeções intravenosas de miricetina (1mg/kg, 3 vezes ao dia) durante 14 dias e os resultados obtidos pelos autores também mostraram uma redução significativa nos altos níveis de glicemia e nos níveis de triglicerídeos plasmáticos (LIU et al., 2007).

A partir dos dados descritos acima, é possível verificar a eficiência de vários compostos bioativos e, especificamente dos flavonóides, na prevenção e tratamento do diabetes. Desta forma fica evidente a necessidade de melhor compreender os efeitos dos antioxidantes naturais contidos em plantas medicinais e dietéticas com interesse na prevenção de estresse oxidativo que se apresenta como fator complicador do diabetes.

2 Objetivos

Objetivo geral

Avaliar o efeito do extrato bruto de folhas de *Eugenia uniflora* L. e de compostos bioativos isolados (quercetina e miricetina) na citotoxicidade, citoproteção e funcionalidade de células secretoras de insulina RINm5f.

Objetivos específicos

1. Obter o extrato bruto aquoso e alcoólico de *Eugenia uniflora* L.

2. Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos dos extratos.

3. Determinar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e compostos isolados.

4. Determinar o efeito de diferentes concentrações dos extratos e dos compostos bioativos isolados sobre a integridade de membrana e viabilidade celular.

5. Avaliar o efeito dos extratos e compostos bioativos isolados na funcionalidade celular.

6. Avaliar o possível efeito citoprotetor dos extratos, da quercetina e da miricetina sobre células RINm5f submetidas a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio através dos seguintes parâmetros:

a.) viabilidade celular;

b.) morfologia celular;

c.) concentração protéica da enzima superóxido dismutase;

d.) morte celular (apoptose);

e.) estresse reticular.

3 Material e Métodos

Material biológico

3.1.1 Cultura de células

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a linhagem celular produtora de insulina RINm5f. Esta linhagem imortalizada originária de ilhotas de ratos é derivada de um tumor (insulinoma) induzido por radiação X. Estas células caracterizam-se por produzir e secretar insulina e não produzem somatostatina (ATCC, 2010).

A referida linhagem foi mantida em meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (10000UI de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada e contendo 5% CO_2. As células foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Rui Curi, ICB/USP –SP.

3.1.2 Preparação do extrato vegetal

A coleta de um *pool* de folhas de diversas árvores de *Eugenia uniflora* L. foi realizada no dia 03/11/08, na UEPG, Campus de Uvaranas e a exsicata encontra-se sob o registro 14536 no herbário desta instituição. As mesmas foram deixadas submersas em hipoclorito de sódio (0,2%) por 30 minutos, enxaguadas 3 vezes com água destilada e deixadas para secar a temperatura ambiente por 24h.

3.1.2.1 Extrato Aquoso

Folhas frescas (200g) foram picadas, adicionadas em 3600mL de água destilada e aquecidas a 70 - 80°C por 40min para extração de fenóis. Após o resfriamento, o extrato obtido foi filtrado em

gaze dupla e armazenado em geladeira, protegido da luz, até a liofilização (Modificado: KWON et al., 2006). Após liofilização foram obtidos aproximadamente 15g do extrato aquoso (Figura 4).

Figura 4 – Extrato Aquoso liofilizado de folhas de *Eugenia uniflora* L.

3.1.2.2 Extrato Alcoólico

Folhas frescas (85g) foram picadas e maceradas em 960mL de álcool etílico 95%. Essa mistura foi armazenada (protegida da luz) a temperatura ambiente por 7 dias para extração de fenóis. O extrato obtido foi filtrado em gaze, e, posteriormente concentrado com auxílio de um rotaevaporador, sendo obtido um volume final de 70mL (Modificado: BONGIOLO, 2008).

Reagentes

Foram utilizados reagentes com grau de pureza analítico (P.A). A D-glicose foi adquirida da LABSYNTH Produtos para Laboratório Ltda.; meio de cultura RPMI 1640, penicilina/estreptomicina e soro fetal bovino da Vitrocell; reagentes para tampões do *Western Blot* foram adquiridos da BioRad e os anticorpos anti-Bax e anti-SOD da Santa Cruz e anticorpos anti-Kdel da StressGen. Paraformaldeído, MTT, quercetina e miricetina foram adquiridos da Sigma Chemical; tripsina foi adquirida da Life Technologies (GibcoBRL) e o dimetil sulfóxido (DMSO) da Biotec.

Metodologias

3.1.3 Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos do extrato

A concentração de fenóis totais presentes no extrato de folhas de pitanga foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteau. Este método baseia-se na produção de óxidos azuis de wolframio (W_8O_{23}) e molibdênio (M_8O_{23}) a partir da oxidação de compostos fenólicos em meio básico (MOYER et al., 2002). Para tal, uma curva padrão de catequina foi feita com várias concentrações de 40 até 200µg/mL. A elas foi adicionado 4,2mL de água destilada e 0,25mL do reagente de Folin-Ciocalteau. Após 3min, adicionou-se 0,5mL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo os tubos deixados em repouso por 60min em temperatura ambiente e protegido da luz.

O mesmo procedimento foi realizado simultaneamente com as amostras dos extratos que foram previamente diluídos. O extrato aquoso foi diluído 1:5 e o alcoólico 1:200 e retirada uma alíquota de 50µL de ambos.

As leituras das absorbâncias foram realizadas a 720nm em espectrofotômetro (Biotek, µQuant) e os resultados foram expressos em µg de fenólicos totais em equivalente de catequina por mL de extrato.

3.1.4 Determinação da atividade antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante total dos extratos brutos e compostos isolados foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes na amostra em sequestrar o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). O método baseia-se na captura do radical DPPH por antioxidantes com conversão para sua forma reduzida que, consequentemente, produz um

decréscimo da absorbância. Ou seja, nesta reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se violeta-clara até atingir a coloração amarela, sendo que o grau deste descoramento indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre.

A partir dos extratos aquoso e alcoólico obtidos e dos compostos isolados foram preparadas diluições nas concentrações de 1000 a 31,25µg/mL para os extratos e de 1000 a 3,13µg/mL para os compostos isolados. Em ambiente escuro foi transferido 50µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio contendo 1,95mL de solução do radical DPPH 0,1mM (em álcool metílico), e homogeneizado. Em um outro tubo de ensaio com 1,95mL de solução do radical DPPH foram adicionados 50µL da solução controle (solvente do extrato). Após 30min de reação, 200µL das amostras foram transferidas para placa de 96 poços para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro (Biotek, µQuant) a 517nm, utilizando-se o álcool metílico como branco (RUFINO et al., 2007).

O decaimento da absorbância das amostras (Aa) correlacionado ao decaimento da absorbância do controle (Ac) resulta na porcentagem de inibição de radicais livres **(% IRL**), que pode ser expressa através da equação:

$$\textbf{\% IRL} = \frac{Ac - Aa \times 100}{Ac}$$

3.1.5 Avaliação da viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), de acordo com o método descrito por Mosmann (1983). Esse método é utilizado como um indicativo da atividade metabólica, através da avaliação da integridade mitocondrial e baseia-se na capacidade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial em reduzir o MTT a cristais de formazan. A quantidade de formazan em cada amostra

foi determinada em espectrofotômetro a 546nm (Biotek, µQuant). Neste teste, os parâmetros avaliados foram a viabilidade celular e a IC50 (concentração que iniba em 50% a viabilidade celular). Em todos os ensaios foi incluído controle de solvente (DMSO) e todas as concentrações testadas de quercetina e miricetina continham a mesma concentração final de solvente que o controle DMSO.

3.1.5.1 Citotoxicidade dos Extratos e Compostos Isolados

As células (5.10^4célula/poço) foram cultivas por 24h para adesão em placa de 96 poços. Posteriormente as células foram cultivadas na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato aquoso (150; 75; 50; 25 e 12,5µg/mL) e alcoólico (500; 250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL) das folhas da pitanga e de compostos bioativos isolados quercetina (25; 12,5; 6,25; 5 e 3,13µg/mL) e miricetina (25; 12,5; 6,25; 5 e 3,13µg/mL) por 46h. Após cultivo, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com PBS a temperatura ambiente. Foram adicionados a cada poço 200µL de uma mistura constituída de MTT (5mg/mL) e meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino na proporção de 1:10 (concentração final de MTT 0,5mg/mL). As células foram incubadas por 1h em estufa a 37°C. Após incubação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado (formazan) foi extraído com a adição de 200µL de DMSO.

A partir deste ensaio foram determinadas as concentrações de extrato que mantinham a viabilidade celular igual ou superior a 90%. Essas concentrações foram as utilizadas nos demais ensaios.

3.1.5.2 Citoproteção dos Extratos e Compostos Isolados em Exposição Aguda e Crônica

As células (5.10^4célula/poço) foram pré-incubadas por 24h para adesão em placa de 96 poços. Posteriormente as células foram cultivadas na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato aquoso (75; 50; 25 e 12,5µg/mL) e alcoólico (250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL) e de compostos bioativos isolados quercetina (6,25 e 3,13µg/mL) e miricetina (12,5; 6,25e 3,13µg/mL), com diferentes tempos de exposição (ensaio agudo e crônico). Em seguida foi adicionada solução de H_2O_2 na concentração final de 150µM por 2h. As células foram então lavadas (PBS) e adicionou-se em todos os poços solução de MTT (5mg/mL) e as células foram mantidas em estufa a 37°C, por 1h. Então o precipitado (formazan) foi extraído com a adição de 200µL de DMSO e a absorbância foi determinada.

No ensaio agudo, o tempo de exposição aos extratos e aos compostos isolados foi de 1h com posterior adição da solução de H_2O_2. No ensaio crônico, o tempo de exposição aos extratos e aos compostos isolados foi de 24h e as células foram lavadas antes da adição da solução de H_2O_2. Sendo assim, houve interação direta entre os extratos e compostos isolados com o H_2O_2, no ensaio agudo; enquanto que no ensaio crônico esta interação foi apenas de forma indireta. Este procedimento foi mantido nas demais análises realizadas.

3.1.6 Avaliação da integridade de membrana (azul de Tripan)

O tripan é um corante vital que permite avaliar a viabilidade celular, corando em azul apenas as células cuja integridade de membrana celular esteja comprometida. Para isso, o número de células viáveis foi analisado a partir da contagem em câmara de Neubauer, onde uma alíquota de 100µL da amostra foi diluída 1:2 em azul de tripan 0,4%. O número de células viáveis e não

viáveis foi contado sob microscópio ótico (Nikon Eclipse E200) (COSTA et al., 1993). Desta forma, as células (5.10^4célula/poço) foram pré-incubadas por 24h para adesão em placa de 96 poços. Posteriormente foram cultivadas na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato aquoso (75; 50; 25 e 12,5µg/mL) e alcoólico (250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL) e de compostos bioativos isolados quercetina (6,25 e 3,13µg/mL) e miricetina (12,5; 6,25e 3,13µg/mL), por 46h.

A porcentagem de viabilidade é dada pela seguinte relação:

$$\textbf{\% viabilidade} = \frac{\text{número de células viáveis x 100}}{\text{número total de células}}$$

3.1.7 Avaliação da morfologia celular

A morfologia celular foi observada por meio da coloração Hematoxilina-Eosina (HE). A hematoxilina é um corante básico que carrega uma carga positiva na porção da molécula que irá conferir cor azul ao tecido. Corantes básicos reagem com componentes aniônicos das células e tecidos, os quais incluem grupos fosfatos, ácidos nucléicos, grupos sulfatos de glicosaminoglicanas e grupos carboxila das proteínas. Estruturas celulares que podem ser coradas com corantes básicos incluem heterocromatina, nucléolo e RNA ribossômico. Corantes ácidos (eosina) reagem com componentes catiônicos das células e tecidos. Quando usados juntamente com corantes básicos como a hematoxilina, coram o citoplasma e filamentos citoplasmáticos. A eosina geralmente cora as estruturas em vermelho ou rosa.

3.1.7.1 Morfologia Celular na exposição Crônica

Células foram plaqueadas na concentração de 1.10^5célula/poço, em placas de 24 poços e incubadas 24h para adesão. Os extratos e compostos isolados foram adicionados (1mL) seguindo-se as concentrações não tóxicas determinadas pelo ensaio de viabilidade celular (MTT), sendo estas 75, 50 e 25µg/mL para extrato aquoso; 250µg/mL para o extrato alcoólico e 6,25 e 3,13µg/mL para a quercetina. Como nenhuma concentração de miricetina apresentou citoproteção, esta não foi testada. Após 24h de contato, o meio foi desprezado e as células foram lavadas com tampão PB 0,1M para então adição de solução de peróxido de hidrogênio (150µM/2h). As células foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C.

Em seguida, as células foram novamente lavadas com tampão PB 0,1M para posterior fixação com paraformaldeído (PFA) 4% por 15min. Após esse processo, as células foram novamente lavadas e deixadas na estufa a 37°C para secar.

Procedeu-se com a coloração, onde água destilada foi adicionada às placas para re-hidratação, por 10min. Desprezou-se a água e colocou-se o corante hematoxilina por 5min. As placas foram mantidas com água destilada por mais 10min e posteriormente foram coradas com eosina (3min). Por fim, as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada e mantidas a temperatura ambiente para secagem. A análise foi realizada em microscopia óptica invertida (Medilux) no aumento de 800vezes.

3.1.7.2 Morfologia Celular na Exposição Aguda

Células foram plaqueadas na concentração de 2.10^5célula/poço, em placas de 24 poços e incubadas 24h para adesão. Os extratos e compostos isolados (1mL) foram adicionados seguindo-se as concentrações determinadas pelo ensaio de viabilidade celular (ensaio do MTT). As concentrações testadas foram 50µg/mL para o extrato aquoso; 3,13µg/mL para a quercetina e 12,5µg/mL para a miricetina. O extrato alcoólico não apresentou efeito citoprotetor, não sendo, portanto testado. Após 1h de contato, foi adicionado solução de peróxido de hidrogênio (150µM/2h). As células foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C. Posteriormente, procedeu-se com a fixação e coloração conforme descrito para ensaio crônico. A análise foi realizada em microscopia óptica invertida (Medilux) no aumento de 800vezes.

3.1.8 Determinação da secreção estática de insulina (Curva Dose-Resposta)

Para determinação da secreção estática aguda de insulina, as células foram cultivadas (5.10^5célula/poço) em placas de 24 poços e incubadas 22h para adesão. Em seguida o meio de cultura foi desprezado por inversão das placas, as células lavadas com PBS a temperatura ambiente e 1mL da solução de Krebs Henseleit (KH) (NaCl 115mM, $NaHCO_3$ 24mM, KCl 5mM, $MgCl_2.6H_2O$ 1mM, $CaCl_2.2H_2O$ 1mM) contendo 0,2% de albumina sem glicose foi adicionada em cada poço e as placas foram pré-incubadas por 30min em estufa a 37°C. Após período de pré-incubação, a solução foi desprezada e adicionou-se em cada poço 1mL da solução a ser testada, conforme a tabela abaixo:

Tabela 3 – Grupos avaliados quanto à secreção de insulina.

Grupo	Tratamento
Controle (com e sem DMSO)	KH 0,2% de albumina/ 5,6mM glicose
Controle Potássio alto	KH 0,2% de albumina/ 5,6mM glicose/ 30mM potássio alto
*Extratos e compostos isolados	KH 0,2% de albumina/ 5.6mM glicose/ diferentes concentrações de extratos

*Os extratos e compostos isolados foram testados nas concentrações de: 75; 50; 25 e 12,5µg/mL de extrato aquoso; 250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL de extrato alcoólico; 6,25; 3,13µg/mL de quercetina e 12,5; 6,25; 3,13µg/mL de miricetina.

As células foram então incubadas por 60min em estufa a 37°C. Após incubação, o sobrenadante de cada poço foi suavemente homogeneizado e uma amostra de 500µL transferida para tubos de microcentrífuga (1,5mL) devidamente identificados. O total de amostras foi congelado a -20°C para determinação da concentração de insulina por radioimunoensaio.

O método de radioimunoensaio baseia-se na competição entre a insulina (humana) marcada com o radioisótopo I^{125} e a insulina não-marcada (insulina secretada pelas células RINm5f) pelo anticorpo anti-insulina (1:200) derivado de cobaia (*guinea pig*). Uma curva-padrão foi preparada utilizando-se concentrações conhecidas de insulina não-marcada. A partir desses resultados foi possível determinar a concentração de insulina presente nas amostras. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000), uma modificação do método original, descrito por Morgan e Lazarow (1963) e Pupo e Marriero (1970), que utilizava uma antigamaglobulina de cobaia, produzida em coelho, como precipitante.

3.1.9 Avaliação da expressão protéica por Western Blot

Esta avaliação foi efetuada apenas para o ensaio crônico. Foram semeadas 1.10^6célula/poço em placas de 6 poços e incubadas 24h para adesão, em 3 experimentos independentes. Após esse período, o meio foi removido e foram adicionadas as concentrações de 75µg/mL de extrato aquoso e 250µg/mL de extrato alcoólico por 24h. Após esse período, o meio foi desprezado e as células foram lavadas com PBS e a elas foi adicionada uma solução de 150µM de peróxido de hidrogênio por 2h. Posteriormente, o meio foi novamente desprezado e as células lavadas com PBS frio. Em seguida, adicionou-se 130µl de tampão de extração (RIPA) a cada poço executando-se movimentos de raspagem. Após o rompimento das células, o sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5mL já identificados e mantidos em gelo por 15min. Então o material foi centrifugado a 12.000rpm por 15min a 4°C sendo o sobrenadante posteriormente transferido para tubos de microcentrífuga de 0,5mL devidamente identificados para descarte de material precipitado. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi determinada através do método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

Após a determinação do conteúdo protéico, em cada amostra de extrato total foi adicionada tampão Laemmli (5 vezes concentrado) com DTT (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1M, pH 7,0; glicerol 50%, SDS 10% e água destilada). A mistura foi fervida por 5min. Após fervura, a mistura foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) no sistema MINI-PROTEIN BIO-RAD®. O volume aplicado em cada pocinho do gel foi definido de forma a conter a mesma quantidade de proteína em todas as amostras (30µg).

A transferência das proteínas foi realizada a partir de um "sanduíche" montado da seguinte maneira: esponja, 2 folhas de papel de filtro, gel, membrana de PVDF, 2 folhas de papel de filtro e outra esponja. Este "sanduíche" foi acomodado em uma cuba de eletroforese, contendo tampão de transferência (Tris-Base 25mM, glicina 192mM, 200mL de metanol 20%, SDS 0,02% e água destilada q.s.p 1000mL). A transferência foi realizada a 120V por cerca de 90min.

Prosseguiu-se com a ligação de anticorpos específicos para as proteínas de interesse, sendo estas: Bax; SOD e Kdel.

Os sítios da membrana de PVDF sem proteína foram previamente bloqueados com proteínas do leite. As membranas foram incubadas por 2h a temperatura ambiente, sob agitação, em solução 5% de leite desnatado em solução basal (10mL de Tris-Base 1M, 30mL de NaCl 5M, 500µL Tween 20 e água destilada q.s.p 1000mL). Os anticorpos utilizados foram: anti-SOD e anti-Bax proveniente de coelho e anti-Kdel proveniente de camundongo, na diluição 1:1000. As membranas foram incubadas de 4–6h, a temperatura ambiente na presença dos diferentes anticorpos previamente diluídos em solução 3% de albumina com solução basal. Após lavagem (3 vezes de 10min cada), sob agitação, com solução basal, as membranas foram incubadas, a temperatura ambiente, com anticorpos secundários anti-IgG de coelho e anti-IGg de camundongo marcados com peroxidase. Esses anticorpos foram diluídos 1:10.000 em solução 1% de leite desnatado com solução basal por 1h. Finalmente, as membranas foram lavadas (3 vezes de 10min cada), sob agitação, em solução basal e, posteriormente, reveladas.

A revelação foi feita por quimioluminescência através do sistema luminol/ácido cumárico/peróxido de hidrogênio. As membranas foram cuidadosamente recobertas com a mistura de luminol e após 2min de reação, o líquido excedente foi desprezado e as membranas foram

ensacadas e expostas (protegidas da luz) ao filme de raio-X por tempo variável (de 5s a 30min).

3.1.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), pelo programa GraphPad Prism Stat 4, adotando-se como limite mínimo de significância $p < 0,05$.

4 Resultados

Os resultados estão organizados em dois capítulos correspondentes aos artigos científicos:

Capítulo I

AÇÃO CITOTÓXICA DE EXTRATOS BRUTOS DE *Eugenia uniflora* L. E DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS E EFEITO SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA

Capítulo II

ATIVIDADE CITOPROTETORA DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. E COMPOSTOS ISOLADOS EM CÉLULAS RINm5f SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR H_2O_2.

Capítulo I

AÇÃO CITOTÓXICA DE EXTRATOS BRUTOS DE *Eugenia uniflora* L. E DE COMPOSTOS BIOATIVOS ISOLADOS E EFEITO SOBRE A FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS SECRETORAS DE INSULINA

Simoní Marinéia Braatz[1], Elise Tatiane Felipe[1], Carla Cristine Kanunfre[1], Marlene dos Santos Rocha[2], Angelo Rafael Carpinelli[2], Eliana Beleski Borba Carneiro[1], Henriette Rosa de Oliveira Emilio[1], e-mail: smbraatz_18@yahoo.com.br.

[1]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral – Ponta Grossa – PR

[2]Universidade de São Paulo/Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/USP – São Paulo - SP

Resumo

Folhas de pitanga são utilizadas na medicina popular como uma alternativa para o tratamento do diabetes mellitus e muitas das suas propriedades são atribuídas a sua composição rica em compostos fenólicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e a toxicidade dos extratos brutos das folhas de *Eugenia uniflora* L., e de dois compostos fenólicos comumente encontrados nos extratos: quercetina e miricetina, além do efeito destes sobre a funcionalidade de células RINm5f. O conteúdo total de fenóis nos diferentes extratos obtidos foi 440,27µg/mL e 37,83µg/mL equivalentes de catequina/mg de extrato aquoso e alcoólico, respectivamente (método de Folin-Ciocalteau). A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo método de captura do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). O extrato aquoso apresentou um IC50 de 321,50µg/mL, a miricetina de 152,63µg/mL e a quercetina de 110,278µg/mL. O extrato alcoólico não apresentou significativa atividade antioxidante. A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). Esta se manteve superior a 90% entre as concentrações de 12,5 – 75µg/mL e 31,25 – 500µg/mL para os extratos aquoso e alcoólico, respectivamente. Já para a quercetina e miricetina esta faixa encontra-se entre as concentrações de 3,13 – 6,25µg/mL e 3,13 – 12,5µg/mL, respectivamente. Quanto a funcionalidade celular, o extrato aquoso e a quercetina não interferiram na secreção de insulina. Já a miricetina causou redução na secreção de insulina na menor concentração testada (3,13µg/mL) enquanto que o extrato alcoólico aumentou aproximadamente 3 vezes a secreção deste hormônio. O efeito insulinotrópico do extrato alcoólico possivelmente não é resultado de sua ação antioxidante, podendo estar relacionado com a interação com proteínas, modulação de cascatas intracelulares e/ou modulação da expressão gênica, uma vez que o extrato alcoólico apresentou baixo conteúdo de compostos fenólicos e reduzida atividade oxidante. Os resultados apresentados são um indicativo de que a *E. uniflora L.* possa ser usada no tratamento alternativo do diabetes mellitus, comprovando o uso desta junto à medicina popular.

Palavras-chave: atividade antioxidante, citotoxicidade, extrato vegetal, flavonóide.

Introdução

Grande parte da população mundial, principalmente aqueles de países em desenvolvimento, usam extratos vegetais e diversas porções de plantas, como cascas, raízes e folhas, como medicamento (GALHIANE et al., 2006). Várias comunidades e grupos étnicos utilizam o conhecimento empírico sobre plantas medicinais como o único recurso terapêutico. Há diversos usos para os extratos vegetais, e dentre eles destaca-se o terapêutico para o controle e/ou prevenção de doenças (VIZZOTTO, 2006). Portanto, estudos têm sido realizados para comprovar a base farmacológica do uso popular de plantas medicinais. Mesmo sendo a flora brasileira considerada a mais rica do mundo, esta foi ainda pouco analisada por estudos etnofarmacológicos (em torno de apenas 8%), perdendo-se a oportunidade de encontrar alternativas de desenvolvimento de novos medicamentos (LORENZI; MATOS, 2002).

Nas Américas, muitas plantas são popularmente usadas no controle do diabetes mellitus. Acredita-se que o efeito antidiabético ocorra devido a substâncias antioxidantes presentes nessas plantas, já que a patogênese dessa doença é assinalada por estresse oxidativo (BAYNES; THORPE, 1999; WEST, 2000; TANIKAWA; TORIMURA, 2006; AHMED; FATANI, 2005). Sendo assim, os antioxidantes naturais contidos em plantas medicinais e dietéticas são foco de interesse por serem candidatos a prevenção de estresse oxidativo (VELÁZQUEZ et al., 2003).

Diabetes mellitus é um grupo de doenças de disfunção metabólica com diferentes etiologias. Caracteriza-se por uma hiperglicemia devido a pouca utilização da glicose que pode ocorrer por ausência ou resistência periférica à insulina. Em condições fisiológicas, a manutenção da normoglicemia é garantida, principalmente, através da secreção de insulina, que por sua vez promove a captação, o armazenamento e a rápida utilização da glicose por quase todos os tecidos

do organismo, especialmente pelos músculos, tecido adiposo e fígado. O papel exercido pela insulina e seus efeitos ocorrem quando esta se liga ao seu receptor na parte externa da membrana celular. Essa ligação inicia uma cascata de fosforilação no interior da célula, que, entre outras coisas, promove a fosforilação e consequente ativação de transportadores de glicose. Isso faz com que essa molécula penetre na célula e participe dos processos metabólicos em que está envolvida.

As células que produzem a insulina são particularmente susceptíveis aos radicais livres devido à baixa expressão e concentração de enzimas antioxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996; TIEDGE et al. 1997; FU-LIANG et al., 2005; KANG et al., 2005). Portanto, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio por elevada atividade mitocondrial ou da NADPH oxidase nestas células e falhas na defesa antioxidante elevam esse risco (NEWSHOLME et al., 2007).

Os principais efeitos terapêuticos atribuídos às folhas de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) em infusão são: ação hipotensora, antigota, anti-reumática, digestiva e hipoglicemiante. Ainda é popularmente utilizada em distúrbios estomacais, como antipirética, diurética e anti-inflamatória, dentre outros, e como coadjuvante no tratamento médico convencional da diabetes mellitus, mesmo não sendo muitas vezes revelado pelos pacientes aos médicos (ALMEIDA et al., 1995; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1988).

O efeito terapêutico contra o diabetes mellitus atribuído às folhas de pitanga é devido a sua ação comprovada como hipoglicemiante (ARAI et al., 1999). Além disso, ela é rica em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes. Dentre estes compostos, diversos autores relatam encontrar quercetina e miricetina em maior quantidade (BANDONI et al., 1972; CONSOLINI; BALDINI; AMAT, 1999; CONSOLINI; SARUBBIO, 2002; AURICCHIO, 2007; SCHMEDA-

HIRSCHMANN et al., 1987).

A quercetina e a miricetina apresentam poder de remover os radicais livres e seu desempenho terapêutico tem sido mencionado por vários autores no combate de estresse oxidativo (SONG et al., 2005). Sendo assim, exercem um papel citoprotetor em situações de risco de dano celular.

Neste sentido, autores demonstram que a ingestão de alguns tipos específicos de flavonóides, como a quercetina e a miricetina, está inversamente associada à incidência do diabetes tipo 2 (KNEKT et al., 2002). No estudo realizado por Coskun et al. (2005), o pré-tratamento com quercetina em ratos diabéticos levou à redução do nível de insulina plasmática e prevenção do aumento do nível de glicose. Além disso, Ong e Khoo (2000) sugerem que a miricetina apresenta potencial terapêutico no tratamento do diabetes com redução da hipertrigliceridemia até os parâmetros normais e ação hipoglicemiante.

Este trabalho tem o objetivo de conhecer e avaliar o potencial antioxidante e citotóxico de extratos de *Eugenia uniflora* L. e de compostos bioativos isolados e seu efeito na funcionalidade de células secretoras de insulina.

Material e Métodos

Materiais

O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Vitrocell; MTT, quercetina e miricetina foram adquiridos da Sigma Chemical; tripsina foi adquirida da Life Technologies (GibcoBRL) e o dimetil sulfóxido (DMSO) da Biotec. As células foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Rui Curi, ICB/USP –SP.

Cultura de células

Células RINm5f foram cultivadas em meio RPMI 1640, 10% de SFB e 1% de antibiótico (10000UI de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada e contendo 5% CO_2.

Extrato vegetal

As folhas frescas de *Eugenia uniflora* L. foram coletadas na forma de um *pool* de diversas árvores na UEPG (Campus de Uvaranas) e a exsicata encontra-se sob o registro 14536 no herbário desta instituição.

Extrato Aquoso

Folhas frescas (200g) foram picadas e aquecidas juntamente com 3600mL de água destilada a 70 - 80°C por 40 min para extração de fenóis. O extrato foi filtrado em gaze dupla e armazenado em geladeira, em vidro escuro, até liofilização (rendimento: 15g).

Extrato Alcoólico

Folhas frescas (85g) foram picadas e maceradas em 960mL de álcool etílico 95% e armazenado (protegido da luz) em temperatura ambiente por 7 dias para extração de fenóis. O extrato foi filtrado em gaze dupla, e, após esse processo, o volume concentrado por rotaevaporação (rendimento: 70mL).

Quantificação de compostos fenólicos dos extratos

A concentração de fenóis totais presentes nos extratos de folhas de pitanga foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteau. A curva padrão de catequina foi feita nas concentrações de 40 a 200µg/mL. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 720nm em espectrofotômetro (Biotek, µQuant) e os resultados foram expressos em µg de fenólicos totais em equivalente de catequina por mL de extrato.

Determinação da atividade antioxidante (DPPH)

A partir dos extratos aquoso e alcoólico obtidos e dos compostos isolados foram preparadas diluições nas concentrações de 1000 a 31,25µg/mL para os extratos e de 1000 a 3.13µg/mL para os compostos isolados. Em ambiente escuro, foi adicionada a cada diluição das amostras e solução controle (solvente do extrato) (50µl), 1,95mL de solução do radical DPPH 0,1mM (em álcool metílico). Após 30min, a leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro a 517nm, utilizando-se o álcool metílico como branco (RUFINO et al., 2007), segundo a equação:

$$\% \text{ IRL} = \frac{\text{Ac} - \text{Aa} \times 100}{\text{Ac}}$$

Citotoxicidade dos extratos e compostos bioativos isolados

Avaliação da viabilidade celular - MTT

As células (5.10^4célula/poço) foram cultivas por 24h para adesão em placa de 96 poços. Posteriormente as células foram cultivadas na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato aquoso (12,5 a 150µg/mL) e alcoólico (31,25 a 500µg/mL) e dos compostos bioativos quercetina (3,13; 5; 6,25; 12,5 e 25µg/mL) e miricetina (3,13; 5; 6,25; 12,5 e 25µg/mL) por 46h. Após cultivo, o sobrenadante foi desprezado, as células lavadas com PBS e foram adicionados 200µL de uma mistura constituída de MTT (5mg/mL) em meio de cultura a cada poço na proporção de 1:10. Estas foram incubadas por 1h em estufa a 37°C. Então o precipitado (formazan) foi extraído com a adição de 200µL de DMSO e determinado em espectrofotômetro a 546nm. Neste teste, os parâmetros de avaliação observados foram à porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração que iniba 50% do crescimento celular).

Avaliação da integridade de membrana - azul de Tripan

A permeabilidade da membrana foi avaliada em câmara de Neubauer, seguindo-se o mesmo procedimento descrito no ensaio do MTT. As células (5.10^4célula/poço) foram pré-incubadas por 24h para adesão em placa de 96 poços. O número de células viáveis e não viáveis foi contado sob microscópio ótico (Nikon Eclipse E200). As concentrações testadas foram aquelas nas quais foi obtido resultados com viabilidade celular superior a 90% no ensaio do MTT, sendo estas: 12,5; 25; 50 e 75µg/mL para o extrato aquoso; 31,25; 62,5; 125 e 250µg/mL para o alcoólico; 3,13; 6,25 e 12,5µg/mL para quercetina e miricetina, por 46h. Em seguida as células foram tripsinizadas (Tripan 0,4%) e contadas em câmara de Neubauer.

A porcentagem de viabilidade é dada pela seguinte relação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{número de células viáveis} \times 100}{\text{número total de células}}$$

Determinação da secreção estática de insulina

A concentração de insulina nas amostras obtidas após secreção estática (curva dose-resposta) foi determinada por radioimunoensaio. Para determinação da concentração de insulina presente nas amostras, uma curva-padrão de insulina foi simultaneamente preparada. As células foram cultivadas (5.10^5célula/poço) em placas de 24 poços e incubadas 22h para adesão. Em seguida as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 1mL da solução de Krebs Henseleit (KH) contendo 0,2% de albumina sem glicose por 30min, sendo estas mantidas em estufa a 37°C. Após período de pré-incubação, a solução foi desprezada e adicionou-se em cada poço 1mL das soluções a serem testadas (12,5; 25; 50 e 75µg/mL de extrato aquoso; 31,25; 62,5; 125 e 250µg/mL de extrato alcoólico; 3,13 e 6,25µg/mL de quercetina e 3,13; 6,25 e 12,5µg/mL de miricetina). As

placas foram incubadas por 1h em estufa a 37°C. Após incubação, o sobrenadante foi suavemente homogeneizado e amostras retiradas para determinação da concentração de insulina. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado pela adsorção do hormônio ao polietilenoglicol (PM 6000), uma modificação do método original, descrito por Morgan e Lazarow (1963) e Pupo e Marriero (1970).

Para certificação dos resultados, foi realizado controle positivo com potássio alto. A secreção de insulina deste foi cerca de 5 vezes maior em relação ao controle.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), pelo programa GraphPad Prism Stat 4, adotando-se como limite mínimo de significância $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação do conteúdo de compostos fenólicos do extrato

A concentração de fenóis totais (n = 3) presentes no extrato aquoso e alcoólico de folhas de pitanga foi de 440,27µg/mL equivalentes de catequina/mg de extrato aquoso e de 37,83µg/mL equivalentes de catequina/mg de extrato alcoólico, respectivamente.

Determinação da atividade antioxidante (DPPH)

O valor do IC50 encontrado para o extrato aquoso foi de 321,50µg/mL (Figura 1a) e não foi obtida atividade antioxidante nas concentrações de 31,25 e 62,5µg/mL (dados não mostrados). Já o extrato alcoólico não demonstrou significante efeito inibitório, sendo que apenas com elevada concentração do extrato (1000µg/mL) conseguiu-se alguma inibição de radicais livres, sendo esta de 6,18% (dados não mostrados).

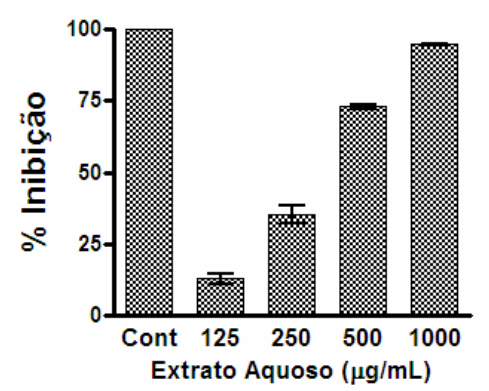


Figura 1a – Atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de *Eugenia uniflora* L. representado pela % de inibição de DPPH. Controle (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média a partir da equação da reta. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n = 3).

Já os compostos isolados demonstraram efeito inibitório com menor concentração (Figuras 2a e 3a). O IC50 obtido para a quercetina foi de 110,28µg/mL e para miricetina foi de 152,63µg/mL. Entretanto, para a miricetina, as concentrações de 3,13 e 6,25µg/mL não apresentaram atividade antioxidante.

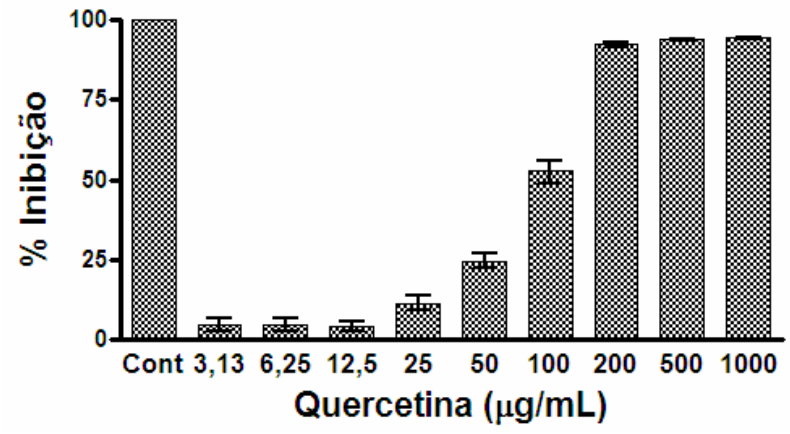


Figura 2a – Atividade antioxidante da quercetina representado pela % de inibição de DPPH. Controle (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média a partir da equação da reta. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n = 3).

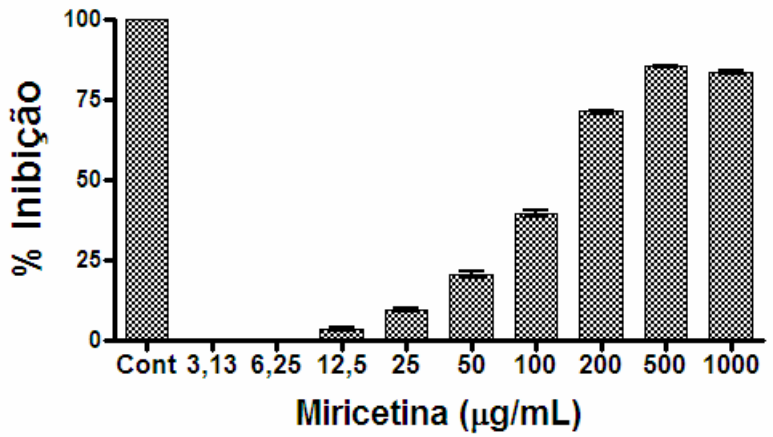


Figura 3a – Atividade antioxidante da miricetina representado pela % de inibição de DPPH. Controle (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média a partir da equação da reta. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n = 3).

Citotoxicidade dos extratos e compostos bioativos isolados

Avaliação da viabilidade celular - MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela atividade mitocondrial. Observa-se que apenas na maior concentração do extrato aquoso (150µg/mL) a viabilidade celular foi inferior a 90%. Já o extrato alcoólico não foi tóxico em nenhuma concentração avaliada. Este é um indicativo de que os extratos apresentam baixa citotoxicidade. Vale a pena destacar que as maiores porcentagens de viabilidade celular foram verificadas nas menores concentrações testadas (Tabela 1a).

Tabela 1a – Citotoxicidade dos extratos aquoso (Aq) e alcoólico (Alc) de folhas de *Eugenia* uniflora L. demonstrados por % de viabilidade celular.

µg/mL	Aq 12,5	Aq 25	Aq 50	Aq 75	Aq 150
Média	103,5	100,8	98,43	98,18	75,94
± erro padrão	± 1,424	±1,601	±1,095	±1,724	± 0,594 ***

µg/mL	Alc 31,25	Alc 62,5	Alc 125	Alc 250	Alc 500
Média	112,5	110,6	106,5	98,87	94,22
± erro padrão	±0,936 ***	± 1,708 ***	± 1,561 **	± 1,004	± 0,643

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes (n = 8), onde ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$.

Com relação aos compostos isolados, a viabilidade celular foi inferior a 90% nas concentrações de 25 e 12,5µg/mL da quercetina e 25µg/mL da miricetina (Tabela 2a).

Tabela 2a – Citotoxicidade da quercetina (Q) e miricetina (M) demonstrados por % de viabilidade celular.

µg/mL	Q 3,13	Q 5	Q 6,25	Q 12,5	Q 25
Média	91,80	90,67	93,03	83,99	53,78
± erro padrão	± 1,539 **	± 1,698 **	± 1,532 *	± 0,887 ***	± 2,930 ***

µg/mL	M 3,13	M 5	M 6,25	M 12,5	M 25
Média	102,3	99,72	96,92	90,73	31,74
± erro padrão	± 1,721	± 1,333	± 0,712	± 1,13 **	± 1,025 ***

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes (n = 8), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$.

As concentrações consideradas seguras (não tóxicas) para as células RINm5f em cultura são aquelas com viabilidade celular ≥ 90%. Portanto, a faixa de concentração correspondente para o extrato aquoso é de 12,5 a 75µg/mL; para o extrato alcoólico é de 31,25 a 500µg/mL; para quercetina é de 3,16 a 6,25µg/mL e para miricetina é de 3,16 a 12,5µg/mL.

Avaliação da integridade de membrana - azul de Tripan

Na presença do extrato aquoso e alcoólico, mais de 90% das células mantiveram a integridade da membrana plasmática. Entretanto, na concentração de 31,5µg/mL do extrato alcoólico, houve um aumento da viabilidade celular superior ao controle, sendo este um indicativo de aumento de proliferação, conforme apresentado na figura 4a.

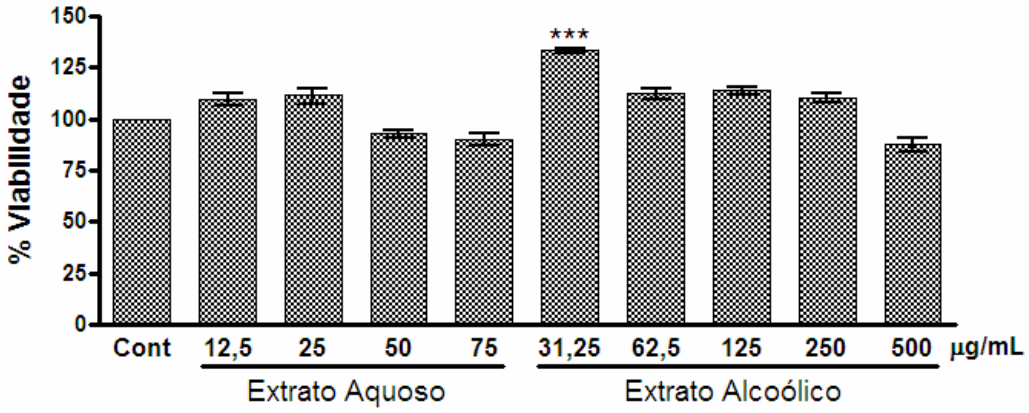


Figura 4a – Integridade de membrana na presença dos extratos aquoso e alcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. demonstrados por % de viabilidade celular. Controle (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA. Os resultados são representativos de 2 experimentos independentes ($n \geq 4$). *** $p < 0,001$.

Em todas as concentrações testadas para os compostos bioativos (quercetina e miricetina) não foi verificado comprometimento da integridade da membrana celular (Figura 5a). Entretanto, foi observado que a concentração de 12,5µg/mL de quercetina apresentou efeito sobre a proliferação celular, com redução do número total de células (Figura 6a).

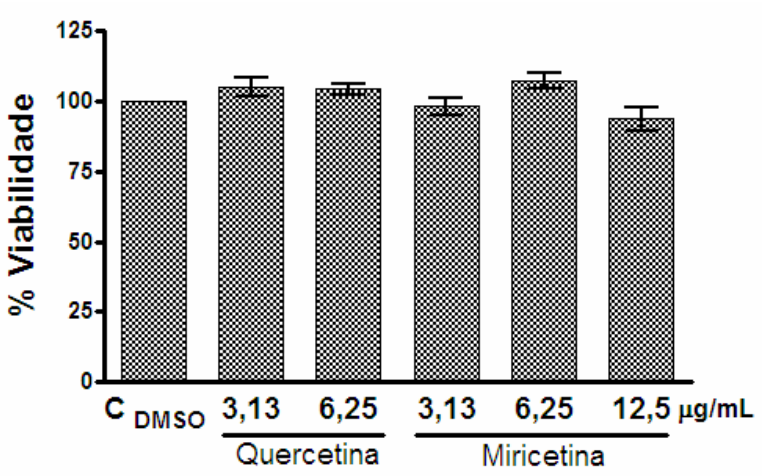


Figura 5a – Integridade de membrana na presença dos compostos quercetina e miricetina demonstrados por % de viabilidade celular. Controle (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n ≥ 4).

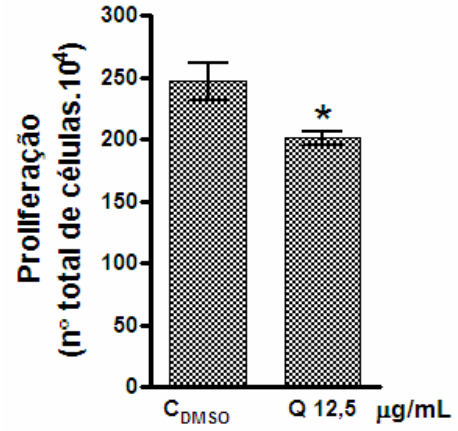


Figura 6a – Efeito da quercetina sobre a proliferação celular através de contagem em câmara de Neubauer. Controle solvente (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n = 6), com * $p < 0,05$.

Determinação da secreção estática de insulina

O extrato aquoso não interferiu na secreção de insulina nas células (Figura 7a). Em contrapartida o extrato alcoólico aproximadamente triplicou a secreção deste hormônio pelas mesmas (Cont = 100%; 31,25µg/mL = 370%; 62,5µg/mL = 330,5%; 125µg/mL = 372%; 250µg/mL = 307,5%). A quercetina também não interferiu na secreção de insulina enquanto que a miricetina apresentou um efeito inibitório na concentração de 3,13µg/mL (Figura 8a). No que diz

respeito ao controle positivo, o controle potássio alto estimulou a secreção de insulina em 5 vezes quando comparado com o controle (Figuras 7a e 8a).

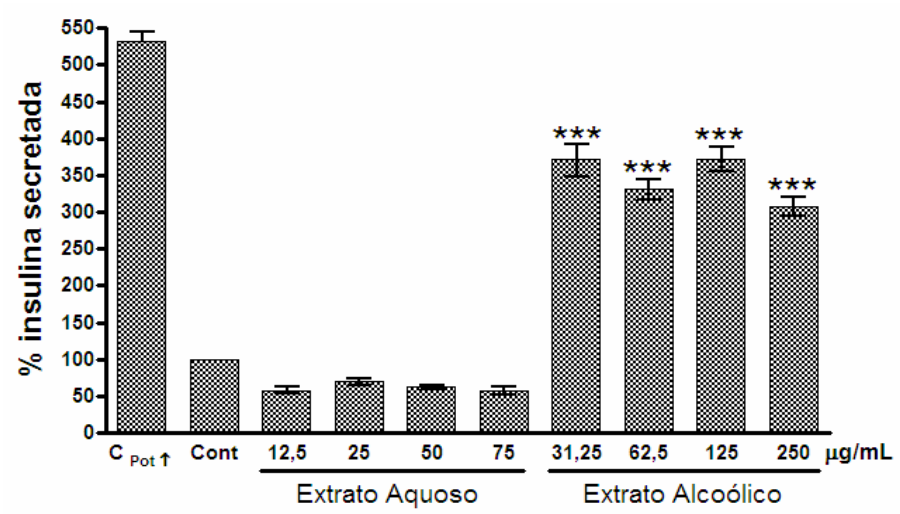


Figura 7a – Secreção de insulina após tratamento com extratos aquoso e alcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (1h). Controle positivo potássio alto 30mM (Cpot↑); controle (Cont). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA, onde ***p < 0,001. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n ≥ 10).

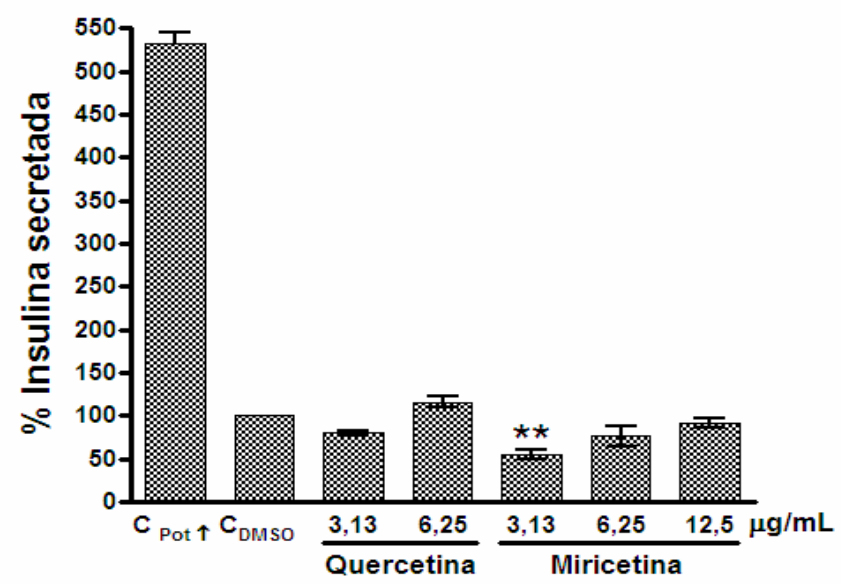


Figura 8a – Secreção de insulina após tratamento com os compostos bioativos quercetina e miricetina (1h). Controle positivo com potássio alto 30mM (Cpot↑); controle (C_{DMSO}). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e analisados por análise de variância ANOVA, onde **p < 0,01. Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n ≥ 10).

Discussão

A atividade antioxidante encontrada para o extrato aquoso apresentou um IC50 de 321,50µg/mL evidenciando a presença de compostos de solubilidade diferentes dos presentes no extrato alcoólico pois, neste estudo, não foi possível determinar o valor de IC50 do extrato alcoólico. O resultado de baixa atividade antioxidante do extrato alcoólico não corroborou com os valores encontrados na literatura. Segundo Boscolo et al. (2007), o extrato alcoólico das folhas de *Eugenia uniflora* apresentou um IC50 de 245,46µg/mL. Essa diferença pode ter sido causada pela forma de extração das folhas, uma vez que estes autores ferveram as folhas secas em etanol PA (96%) durante 3min em forno de microondas, na potência máxima. É notória a dificuldade de avaliação entre os resultados quando se comparam estudos com plantas medicinais devido ao número de variáveis que vão desde estágio do desenvolvimento do vegetal, quando da coleta, parte da planta estudada, maneira do preparo do material, aspectos climáticos que exercem influência na composição química, até os protocolos seguidos.

A atividade antioxidante da quercetina e da miricetina apresentou-se duas vezes maior que do extrato aquoso. Estes dois compostos são amplamente aceitos como bons *scavenger* de espécies reativas. A atividade antioxidante de um flavonóide é determinada principalmente pelo anel B. De um modo geral, quanto maior o número de hidroxilas presentes no anel, maior o potencial como agente doador de H^+ e consequentemente maior a capacidade antioxidante de um flavonóide. Além disso, alguns flavonóides como a quercetina podem apresentar ação indireta, aumentando as defesas antioxidantes celulares por influenciar na transcrição gênica de enzimas antioxidantes e reforçando a capacidade antioxidante celular por poupar/proteger outros antioxidantes intracelulares. A propósito, alguns flavonóides têm a capacidade de se associar à vitamina E, e

desta forma funcionar como um potente inibidor da peroxidação lipídica e consequentemente como protetor de membranas celulares (MARTINEZ-FLORES, 2002). A atividade de *scavenger* de radicais dos flavonóides foi descrita como seguindo a ordem decrescente: mircetina > quercetina > rhamnetina > morina > diosmetina > naringenina > apigenina > catequina > 5,7 – dihidroxi-3',4'5'–trimethoxiflavona robinina > kaempferol > flavona (RATTY, 1988). Contudo, estudos recentes revisados por Lee e Lee (2006) mostram que terapias com antioxidantes baseadas em compostos fenólicos capazes de diminuir níveis de ERO podem estar equivocadas devido às atividades pró-oxidante e carcinogênica observadas em certas condições. Este efeito deletério é evidente principalmente quando se faz uso de grandes quantidades de um único composto fenólico isolado, sendo verificado que a suplementação com grandes quantidades de uma única substância antioxidante pode ser deletério para saúde humana. Assim sendo, a combinação de diferentes agentes antioxidantes, que podem possuir diferentes modos de ação, parece ser mais eficiente no aumento da eficácia das substâncias e diminuição da toxicidade relacionada (LEE; LEE, 2006). Além disso, os efeitos adicionais e sinérgicos de fitoquímicos presentes na dieta a partir de frutas e vegetais podem ser os responsáveis pela atividade antioxidante de uma forma mais eficiente que suplementos da dieta.

A comprovação dos efeitos da pitanga se dá por meio da correlação de sua atividade antioxidante e citotóxica. Embora compostos fenólicos tipicamente atuem como antioxidantes, com propriedade citoprotetora, em determinadas condições podem agir como pró-oxidantes. Lapidot, Walker e Kanner (2002) descrevem que o comportamento dos flavonóides ou ácidos fenólicos como antioxidante ou pró-oxidante depende da natureza do estresse oxidativo. Um exemplo é a genisteína que modula a apoptose em células beta. Em ilhotas pancreáticas e em linhagem de células β- pancreáticas, doses baixas de 25μM de genisteína reduziram apoptose induzida por

fluoreto de sódio (NaF) enquanto que altas doses (100µM) a causaram (ELLIOTT; SCARPELLO; MORGAN, 2002). Nos resultados obtidos neste estudo, as concentrações mais altas testadas para quercetina (25 e 12,5µg/mL), miricetina (25µg/mL) e o extrato aquoso (75µg/mL) nas células β-pancreáticas foram citotóxicas enquanto doses mais baixas não interferiram na viabilidade/proliferação celular, exceto na concentração de 31,5µg/mL do extrato alcoólico (aumento de proliferação) e de 12,5µg/mL de quercetina (diminuição de proliferação). Estudos afirmam que o flavonól mais estudado (quercetina) é convertido, *in vitro*, em metabólitos citotóxicos na presença de íons metálicos como ferro e cobre (METODIEWA et al., 1999), o que justificaria sua ação citotóxica em altas concentrações verificadas neste estudo. Vale a pena ressaltar que a citotoxicidade de um determinado flavonóide varia muito de acordo com a susceptibilidade de cada tipo celular. Por exemplo, células Caco-2 e Hep G2 foram expostas a concentrações variando entre 0-200µM de miricetina, quercetina e rutina, por 24h sem ter sido observado comprometimento da viabilidade celular (AHERNE; O'BRIEN, 1999). Além disso, dados na literatura mostram que flavonóides podem ter efeito proliferativo e antiproliferativo. Avila et al. (1994) encontraram que a quercetina inibe a proliferação celular de uma linhagem de células de câncer de mama (MDA-MB468) por inibição do acúmulo de p53 resultando no aumento de células na fase G2-M do ciclo celular. Entretanto, Vessal, Hemmati e Vasei (2003) descreveram aumento significativo no número de ilhotas pancreáticas em ratos diabéticos e não-diabéticos quando tratados com quercetina. Eles justificam que este aumento possa ser devido a um aumento na replicação de DNA nestas células. Sendo assim, depois da perda de células β- pancreáticas tanto na diabetes tipo 1 quanto na tipo 2, pode ocorrer regeneração (TOURREL et al., 2002; MEIER et al., 2005).

Diversos estudos relacionam o efeito de extratos vegetais e flavonóides com o desenvolvimento de diabetes e descrevem que vários desses compostos têm apresentado a capacidade de normalizar a absorção de glicose e a produção e armazenamento de insulina tanto *in vitro* quanto *in vivo*, entretanto estes resultados ainda são muito controversos. As condições experimentais, as concentrações dos compostos testados e o tipo celular analisado são fatores críticos na avaliação dos resultados de compostos fenólicos sobre a secreção de insulina. Um exemplo dessa diversidade de resultados são os estudos com o flavonóide genisteína. Ohno et al. (1993) afirmam que este composto aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose na linhagem celular MIN6, assim como em culturas de ilhotas de ratos, em concentrações de até 100µmol/L. Contudo, concentrações mais elevadas de genisteína, por outro lado, inibem esta secreção (PERSAUD et al., 1999). O mesmo é observado para o resveratrol, em que a concentração de 100µmol/L não causou efeito na secreção de insulina em células MIN6 enquanto que concentrações menores (10 e 30µmol/L) a ativaram efetivamente (CHEN et al., 2007). Em compensação, em outras linhagens celulares, como HIT-T15 e RINm5f, este composto induziu a secreção de insulina nas 3 concentrações testadas (CHEN et al., 2007). Em estudos *in vivo* com quercetina, Vessal, Hemmati e Vasei (2003) demonstraram que a suplementação com este flavonóide foi eficiente na diminuição da glicose sanguínea. Estes autores ainda sugeriram que a diminuição da glicemia em ratos possa ter ocorrido por aumento da secreção de insulina induzida por quercetina, entretanto não foi analisado um efeito direto sobre o pâncreas endócrino e nem avaliação da secreção de insulina, e portanto este efeito pode ter ocorrido por redução da digestão intestinal de carboidratos e gorduras (ARAI et al., 1999) e / ou aumento na ação periférica da insulina (hepática e muscular). Neste estudo, tanto a quercetina quanto a miricetina não afetaram a secreção deste hormônio, exceto na concentração de 3,13µg/mL de miricetina onde foi verificado efeito inibitório.

Além dos compostos isolados, vários estudos também vêm sendo desenvolvidos para avaliar o efeito de extratos vegetais ricos em polifenóis sobre a glicemia e secreção de insulina. Sharma et al. (2006) testaram os extratos aquoso e alcoólico dos frutos de uma planta popularmente utilizada para tratamento de diabetes, também pertencente ao gênero *Eugenia*, denominada *E. jambolana* e obtiveram como resultado que os extratos tiveram efeito hipoglicêmico, sendo o aquoso mais eficiente. Posteriormente, testaram uma fração do extrato aquoso dos frutos desta planta, com 1h de exposição em ilhotas de coelhos na presença de glicose e, encontraram que esta estimulou significativamente a secreção de insulina. Alguns estudos realizados *in vivo* com extrato de folhas de *Eugenia uniflora* demonstraram eficiente ação deste na redução da glicemia. O mecanismo de ação deste extrato sobre o controle glicêmico permanece incerto, porém há indícios de que este atue de forma mais intensa na digestão intestinal de carboidratos e gorduras. Momose (2000) e Matsumura et al. (2000) atribuíram o efeito hipoglicemiante à atividade inibitória do extrato das folhas de pitanga sobre enzimas intestinais, tais como as α – glicosidases, maltase e sucrase. Além da inibição da digestão de açúcares, também é atribuída aos extratos de pitanga a redução na absorção intestinal de gorduras, o que pode ser eficiente no tratamento de diabetes e obesidade (ARAI et al., 1999). Apesar destes estudos sugerindo mecanismos hipoglicemiantes da *E. uniflora*, não havia estudos relacionando ação direta desta sobre as células secretoras de insulina. A partir da avaliação do efeito dos extratos de folhas de *E. uniflora* sobre a secreção de insulina em células RINm5f, foi possível verificar que, diferentemente dos resultados obtidos com *E. jambolana*, o extrato aquoso de folhas de *E. uniflora* não apresentou efeito significativo na secreção de insulina. Entretanto, o extrato alcoólico aumentou expressivamente (aproximadamente 3 vezes) a secreção de insulina quando comparado com o controle. Sabidamente a proteção antioxidante é um dos mecanismos possíveis de

estimulação da secreção de insulina. A partir da análise do extrato alcoólico, foi verificado que este apresenta um conteúdo total de compostos fenólicos e atividade antioxidante muito menores quando comparado ao extrato aquoso. Sendo assim, a atividade antioxidante não parece ser o mecanismo insulinotrópico do extrato alcoólico. É importante ressaltar que a ação insulinotrópica dos flavonóides não se restringe a sua ação antioxidante, podendo estar, mesmo que em baixa concentração, relacionado à secreção de insulina a partir da interação com proteínas, modulação de cascatas intracelulares e modulação da expressão gênica (PINENT et al., 2008). Em linhagens de células secretoras de insulina, por exemplo, a genisteína, flavonóide derivado da soja, estimula a secreção de insulina através do acúmulo intracelular de AMPc e ativação da enzima proteína quinase A (LIU et al., 2006). Já flavonóides derivados do chá verde, tais como a epigalocatequina-3-galato (EGCG) e epicatequina 3-galato (ECG) atuam como secretagogos de insulina a partir da inibição dos canais de potássio sensíveis a ATP, promovendo a despolarização das células β- pancreáticas e consequente exocitose dos grânulos de insulina. Ambos atuam em baixas concentrações (da ordem de 1 a 10 uM), sendo a ECG cerca de três vezes mais efetiva que a EGCG (PINENT et al., 2008).

Portanto, compostos especificamente extraídos na fase alcoólica podem ser os responsáveis pela ação insulinotrópica do extrato de pitanga. Além de flavonóides, terpenos, carboidratos, íons e ácidos orgânicos podem ser extraídos a partir de folhas e merecem ser melhor investigados. O que se pode concluir é que este extrato alcoólico deve conter um princípio ativo que interfira em mecanismos fisiológicos e desta forma estimule a liberação de insulina. O aprofundamento destes estudos, visando principalmente conhecer a composição do extrato alcoólico se faz necessário, uma vez que este parece apresentar um elevado potencial insulinotrópico, podendo ser uma alternativa terapêutica ao paciente diabético.

Considerações finais

Neste estudo, conclui-se que os extratos brutos, aquoso e alcoólico, apresentam baixa toxicidade e variado grau de atividade antioxidante. O extrato aquoso, apesar de significativa ação antioxidante, não teve efeito frente à secreção de insulina. Já o extrato alcoólico, embora não tendo apresentado importante efeito como antioxidante, pode ser eficaz no tratamento alternativo do diabetes mellitus devido ao seu significativo efeito insulinotrópico. Este possivelmente não seja resultado da ação antioxidante, podendo estar relacionado com a interação com proteínas, modulação de cascatas intracelulares e/ou modulação da expressão gênica, uma vez que o extrato alcoólico apresentou baixo conteúdo de compostos fenólicos e reduzida atividade oxidante. Portanto, apesar do provável potencial terapêutico, são necessários estudos complementares referentes à composição do extrato para maior elucidação do possível mecanismo de ação insulinotrópica do extrato alcoólico de *Eugenia uniflora* L.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Capítulo II

ATIVIDADE CITOPROTETORA DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS DE *Eugenia uniflora* L. E COMPOSTOS ISOLADOS EM CÉLULAS RINm5f SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR H_2O_2.

Simoní Marinéia Braatz[1], Elise Tatiane Felipe[1], Márcia Regina Paes de Oliveira[1], Carla Cristine Kanunfre[1], Giovani Marino Fávero[1], Rui Curi[2], Henriette Rosa de Oliveira Emilio[1], e-mail: smbraatz_18@yahoo.com.br.

[1]Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral – Ponta Grossa – PR

[2]Universidade de São Paulo/Departamento de Fisiologia e Biofísica – ICB/USP – São Paulo - SP

Resumo

Espécies reativas são amplamente aceitas como fatores cruciais na progressão do diabetes e de outras doenças por acarretarem estresse oxidativo. Vários estudos demonstram a eficiência de antioxidantes na proteção de células secretoras de insulina, normalmente mais susceptíveis a espécies reativas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citoprotetora dos extratos brutos de folhas de *Eugenia uniflora* L. e de compostos isolados (quercetina e miricetina) em células RINm5f sobre estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em ensaios agudo (1h) e crônico (24h). Para tanto foram utilizadas as seguintes metodologias: redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), coloração por hematoxilina e eosina e expressão protéica por *Western Blot*. O H_2O_2 reduziu, em média, 33% da viabilidade das células no ensaio agudo e aproximadamente 45% no ensaio crônico. O extrato aquoso promoveu citoproteção em ambos os ensaios, nas maiores concentrações testadas, porém esta foi mais significativa para o ensaio crônico. Já o extrato alcoólico apresentou citoproteção apenas quando incubado cronicamente. A quercetina apresentou resultado dose-dependente (6,5 > 3,13µg/mL) no ensaio agudo e preveniu 100% dos danos causados pelo H_2O_2 no ensaio crônico. Além disso, o H_2O_2 alterou a adesão intercelular com intensa modificação na morfologia das células. As células passaram a apresentar um formato mais arredondado, com formação de pregas na membrana e redução da basofilia citoplasmática. Os extratos e compostos isolados preveniram alterações na morfologia causadas por H_2O_2. Na presença destes, algumas células apresentaram forma arredondada, porém sem formação de pregas na membrana plasmática e preservação das projeções citoplasmáticas, mantendo a basofilia citoplasmática semelhante ao controle. Estes dados sugerem prevenção da peroxidação lipídica. A expressão das proteínas superóxido dismutase (SOD), BAX, proteína regulada por glicose 94 (GRP94) e a dissulfito isomerase (PDI) não sofreu variação, entretanto houve aumento da proteína GRP78 indicando estresse reticular na presença do H_2O_2. Desta forma, os resultados sugerem, como primeiro indicativo, que o extrato de *Eugenia uniflora* L. possa ser utilizado na prevenção de danos sobre células secretoras de insulina e consequente desenvolvimento e/ou progressão de diabetes mellitus.

Palavras-chave: citoproteção, extrato vegetal, flavonóides, peróxido de hidrogênio.

Introdução

O processo evolucionário permitiu aos organismos aeróbios desenvolverem mecanismos de defesa para promover a neutralização dos efeitos oxidativos de espécies reativas e de seus metabólitos reativos, denominado de sistemas antioxidantes (KATOCH; BEGUM, 2003). Os sistemas antioxidantes podem ser de característica enzimática ou não enzimática. As principais enzimas envolvidas nesse processo são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx). A SOD é uma proteína capaz de converter ânions superóxido em peróxido de hidrogênio. Posteriormente, pela ação das outras enzimas (CAT e GSH), o peróxido é convertido em moléculas mais estáveis, como a água. Já o mecanismo não enzimático é composto por moléculas capazes de estabilizar as espécies reativas, conhecidas como antioxidantes.

Quando há acúmulo de espécies reativas, seja por superprodução destas ou deficiência nas defesas intracelulares, elas podem causar alterações em estruturas biológicas modificando o metabolismo celular, resultando em diversas patologias como a arterosclerose, artrite, cardiopatias, doenças do sistema imune, catarata, câncer, entre outras (BONDAN, 2006; DROGE, 2002; TURRENS, 2003; FRIDLYAND; PHILIPSON, 2005). Sendo assim, o acúmulo de espécies reativas leva ao estresse oxidativo que é um estágio inicial na patologia do diabetes e pode contribuir para o desenvolvimento das complicações características desta doença, como retinopatia, nefropatia, dislipidemia e neuropatia (NOUROOZ-ZADEH et al., 1997).

Dentre as principais espécies reativas, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (ERO). ERO são tidas como mediadoras de morte celular, pois altos níveis de estresse oxidativo podem causar necrose e baixos níveis deste funcionam como desencadeadores de mecanismos apoptóticos, processo importante em mecanismos fisiológicos (DYPBUKT et al., 1994). Além disso, em

condições de estresse celular, pode ocorrer aumento nos níveis de proteínas mal enoveladas, gerando estresse no retículo endoplasmático, que também desencadeia processos apoptóticos (KANETO et al., 2006). Este processo é acompanhado de aumento da expressão de proteínas reticulares, tais como GRP94 e GRP78 (proteínas reguladas por glicose) e PDI (dissulfito isomerase).

Em ensaios *in vitro*, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um modelo bem estabelecido de indutor de estresse por ser um agente fisiológico presente na maioria dos processos oxidativos independente da causa inicial da oxidação e por apresentar alta reatividade (TANG; ZHANG, 2000). Lennon, Martin e Cotter (1991) e Sah et al. (1999) afirmaram que a exposição de sistemas a baixas doses de H_2O_2 induz apoptose em uma variedade de tipos celulares. Estudos realizados por Fu-Liang et al. (2005) mostraram que doses de 500μM de H_2O_2 aumentaram significativamente a quantidade de espécies reativas de oxigênio resultando em danos às células pancreáticas e redução na secreção de insulina dependente de glicose.

As células produtoras de insulina são particularmente susceptíveis as espécies reativas devido à baixa expressão e concentração das enzimas antioxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996; KANG et al., 2005).

Vários estudos demonstram a eficiência de antioxidantes na proteção de células secretoras de insulina. Por exemplo, a epigalocatequina (constituinte do chá verde) apresenta ação protetora sobre células RINm5f contra danos causados por citocinas (HAN, 2003). Fu-Liang et al. (2005) expuseram ilhotas pancreáticas ao H_2O_2 (500 μM) e obtiveram proteção destas com pré-tratamento com puerarina (isoflavona isolada de *Pueraria lobata*) por meio de redução da taxa de apoptose. Velásquez et al. (2003) verificaram que o extrato de *Eugenia uniflora* L. apresenta ação

antioxidante protegendo contra peroxidação lipídica enzimática e não enzimática de membranas microssomais de ratos e ainda efeito *scanvenger* de radicais livres.

Em geral, folhas e frutos contêm agentes antioxidantes, como os compostos fenólicos. Os compostos fenólicos mais expressivos no extrato das folhas de pitanga são os flavonóides. Dentre estes, os mais abundantes são a quercetina e a miricetina, que, juntamente com a rutina e naringenina, são os flavonóides mais investigados na literatura (HARTMAN; SHANKEL, 1990; REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005). Os flavonóides podem prevenir danos causados por espécies reativas de várias formas. Uma delas é atuando como *scavenger* (ação direta) em que são oxidados pelas espécies reativas resultando em uma molécula mais estável, menos reativa. Isso devido a grande reatividade do grupo hidroxil presente em sua estrutura química (NIJVELDT et al., 2001). Outro mecanismo possível pelo qual os flavonóides atuam é através da interação com vários sistemas enzimáticos (ação indireta). Sendo assim, alguns de seus efeitos podem ser resultantes de uma combinação da ação direta e indireta.

Em suma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade citoprotetora dos extratos brutos de folhas de *Eugenia uniflora* L. e de compostos isolados (quercetina e miricetina) em células RINm5f sobre estresse oxidativo induzido por H_2O_2.

Material e Métodos

Materiais

Foram usados reagentes de qualidade analítica. O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Vitrocell; MTT, quercetina e miricetina foram adquiridos da Sigma Chemical; tripsina foi adquirida da Life Technologies (GibcoBRL) e o

dimetil sulfóxido (DMSO) da Biotec. Reagentes para tampões do *Western Blot* foram adquiridos da BioRad e os anticorpos da Santa Cruz e da StressGen.

Cultura de Células

Células RINm5f (gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Rui Curi – ICB/USP –SP) foram cultivadas em meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (10000 UI de penicilina e 100mg/ml de estreptomicina). As células foram incubadas a 37ºC e mantidas em atmosfera umidificada, contendo 5% CO_2.

Avaliação da Viabilidade Celular – MTT

As células (5.10^4célula/mL) foram pré-incubadas por 24h para adesão em placa de 96 poços. Posteriormente as células foram cultivadas na presença ou ausência de diferentes concentrações do extrato aquoso (75; 50; 25 e 12,5µg/mL) e alcoólico (250; 125; 62,5 e 31,25µg/mL) das folhas da pitanga e dos compostos bioativos quercetina (6,25 e 3,13µg/mL) e miricetina (12,5; 6,25e 3,13µg/mL), em ensaio agudo e crônico, para posterior adição de H_2O_2 na concentração final de 150µM/2h. Posteriormente, solução de MTT (5mg/mL) foi adicionada em cada poço e as células foram mantidas em estufa a 37°C, por 1h. Então o precipitado (formazan) foi extraído com a adição de 200µL de DMSO e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 546nm. No ensaio agudo, o tempo de exposição aos extratos e compostos isolados foi de 1h, com adição posterior de H_2O_2. Já no crônico, o tempo de exposição foi de 24h, sendo o meio substituído por solução de H_2O_2. Sendo assim, houve interação direta entre os extratos e compostos isolados com o H_2O_2, no ensaio agudo; enquanto que no ensaio crônico esta interação foi apenas de forma indireta. Neste teste, os parâmetros de avaliação observados foram à

porcentagem de viabilidade celular e a IC50 (concentração na qual foi verificada 50% de viabilidade celular).

Morfologia Celular

A morfologia celular foi observada por meio da coloração de Hematoxilina - Eosina (H.E.) e posterior observação sob microscópio óptico invertido (Medilux).

Avaliação da Morfologia em Exposição Aguda

Células foram plaqueadas na concentração de 2.10^5célula/poço, em placas de 24 poços e incubadas 24h para adesão. Os extratos e compostos isolados foram adicionados seguindo-se as concentrações que promoveram citoproteção no ensaio de viabilidade celular (MTT), sendo estas: extrato aquoso 50µg/mL; quercetina 3,13µg/mL e miricetina 12,5µg/mL. Como não houve proteção pelo extrato alcoólico no ensaio do MTT, este não foi testado. Após 1h de contato, foi adicionado ao meio solução de peróxido de hidrogênio na concentração final de 150µM/2h. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão PB 0,1M. A fixação foi feita com paraformaldeído (PFA) 4% por 15min. Seguiu-se então com a coloração, onde se adicionou hematoxilina por 5min e eosina por 3min nas placas celulares.

Avaliação da Morfologia em Exposição Crônica

Células foram plaqueadas na concentração de 1.10^5célula/poço, em placas de 24 poços e incubadas 24h para adesão. Os extratos e compostos isolados foram adicionados seguindo-se as concentrações que promoveram citoproteção no ensaio de viabilidade celular (MTT), sendo estas 75, 50 e 25µg/mL para extrato aquoso; 250µg/mL para o extrato alcoólico e 6,25 e 3,13µg/mL para

a quercetina. Como nenhuma concentração de miricetina apresentou citoproteção, esta não foi testada. Após 24h de exposição, o meio foi desprezado e as células foram lavadas com tampão PB 0,1M para então adição de solução de peróxido de hidrogênio a 150µM/2h. Posteriormente, as células foram novamente lavadas com tampão PB 0,1M para posterior fixação com paraformaldeído (PFA) 4% por 15min. Seguiu-se então com a coloração, onde se adicionou hematoxilina por 5min e eosina por 3 min nas placas celulares.

Avaliação da concentração protéica por *Western Blot*

Foram semeadas 1.10^6célula/poço em placas de 6 poços e incubadas 24h para adesão. Após esse período, as células foram tratadas com concentrações de 75µg/mL de extrato aquoso e 250µg/mL de extrato alcoólico por 24h com posterior lavagem e adição de uma solução de 150µM de peróxido de hidrogênio por 2h. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS frio e adicionou-se 130µl de tampão de extração (RIPA-Kit comercial). Após o rompimento das células, o sobrenadante foi mantido em gelo por 15min e então o material foi centrifugado a 12.000rpm por 15min a 4°C. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi determinada através do método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

Após a determinação do conteúdo protéico, em cada amostra de extrato total foi adicionado tampão Laemmli (5 vezes concentrado) com DTT (azul de bromofenol 0,1%; fosfato de sódio 1M, pH 7,0; glicerol 50%, SDS 10% e água destilada). A mistura foi fervida por 5min. Após fervura, a mistura foi submetida à eletroforese a 120V em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-PAGE) no sistema MINI-PROTEIN BIO-RAD. O volume aplicado em cada pocinho do gel foi definido de forma a conter a mesma quantidade protéica em todas as amostras (30µg). O conteúdo foi transferido para membranas de PVDF e incubadas com anticorpos primários anti – Bax e anti –

SOD (Santa Cruz Co.) e anti – Kdel (StressGen) por 4 a 6h, na diluição 1:1000. As membranas foram posteriormente incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo (Santa Cruz Co.) marcados com peroxidase (1:10.000) e então expostas ao filme de raio-X. A revelação foi feita por quimioluminescência utilizando luminol.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), pelo programa GraphPad Prism Stat 4, adotando-se como limite mínimo de significância $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Ensaio de Viabilidade Celular

No ensaio agudo, o peróxido de hidrogênio reduziu a viabilidade celular do grupo controle em aproximadamente 33%, conforme observado na figura 1b. Dentre os extratos, apenas o aquoso, na concentração de 50µg/mL, apresentou um efeito citoprotetor, com viabilidade celular 14,5% maior quando comparado com controle H_2O_2. Lee, Yoon e Park (2008) também obtiveram efeito protetor do pré-tratamento (30min) com uma erva medicinal (*Paeonia lactiflora*) sobre células derivadas de feocromocitoma (tumor de medula adrenal) de ratos induzidas a estresse oxidativo por H_2O_2 (500µM/2h). Este se apresentou dose-dependente, com aumento de viabilidade celular de 5-30% quando comparado com controle H_2O_2. Já em relação aos compostos isolados, a miricetina apresentou efeito citoprotetor apenas na concentração de 12,5µg/mL (proteção média de 15%) enquanto que para a quercetina o resultado foi dose-dependente, onde a concentração de 6,25µg/mL conferiu total proteção (100%) contra o peróxido e na de 3,13µg/mL a citoproteção foi

de aproximadamente 25%. Em conformidade com este trabalho, Sestili et al. (1998) obtiveram resultado de citoproteção às células U937 pela quercetina, de maneira dose-dependente, quando submetidas a estresse oxidativo por *tert*-butil-hidroperóxido (*t*B-OOH – 3mM) por 30min na ausência e presença de diferentes concentrações do flavonól. Com 10µM de quercetina, foi verificada proteção equivalente a 30% quando comparado com grupo controle *t*B-OOH.

No ensaio crônico de citoproteção, o peróxido de hidrogênio reduziu a viabilidade celular do grupo controle em torno de 45%. Os efeitos de citoproteção para as diversas concentrações podem ser observados na figura 2b. O mais significativo observado para o extrato aquoso foi entre suas maiores concentrações testadas (75 e 50µg/mL), que apresentaram viabilidade celular em média 16,5% maior que quando comparado com controle H_2O_2. Já o extrato alcoólico apresentou efeito citoprotetor semelhante (18%) apenas na concentração de 250µg/mL; porém, as concentrações de 62,5 e 31,25µg/mL potencializaram o efeito do H_2O_2. Yoon et al. (2004), em ensaio crônico realizado com células β- pancreáticas (HIT-T15), verificaram citoproteção (viabilidade até 31% maior) após pré-tratamento (24h) com extrato aquoso de *Rheum undulatum* e posterior indução de estresse oxidativo com 100µM de H_2O_2 (3h). Com relação aos compostos isolados, a quercetina demonstrou efeito citoprotetor nas concentrações de 6,25 e 3,13µg/mL, com viabilidade de aproximadamente 12% e 25% maior que o grupo H_2O_2, respectivamente. Efeito protetor pela quercetina também foi verificado por Coskun et al. (2005) quando o pré-tratamento com esta diminui a peroxidação lipídica e a formação de óxido nítrico em células β, além de ter aumentado a atividade de enzimas antioxidantes em ratos induzidos a diabetes por estreptozotocina. Já todas as concentrações de miricetina potencializaram o efeito do peróxido de hidrogênio, apresentando redução de viabilidade de, em média, 10,2%, quando comparado ao controle H_2O_2. Vários estudos demonstram que compostos fenólicos, sob certas condições, podem apresentar efeito pró-oxidante.

Esta condição está normalmente associada com concentrações relativamente elevadas desses compostos. Galati et al. (2002) observaram que compostos fenólicos são metabolizados por peroxidases a radicais pró-oxidantes que, em alguns casos, são suficientes para co-oxidar GSH e NADH, acompanhado de extensivo consumo de oxigênio e formação de ERO. Também foi mostrado que a miricetina sofre auto-oxidação em tampão aquoso de forma a produzir H_2O_2 e $O_2^{\bullet -}$ (CANADA et al., 1990). Além disso, a miricetina é capaz de aumentar a produção de OH^- gerado quando incubada com Fe^{2+} na presença e ausência de H_2O_2. Foi sugerido que, quando não adicionado H_2O_2, a auto-oxidação da miricetina produziu H_2O_2 que reage com o ferro gerando OH^- (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994).

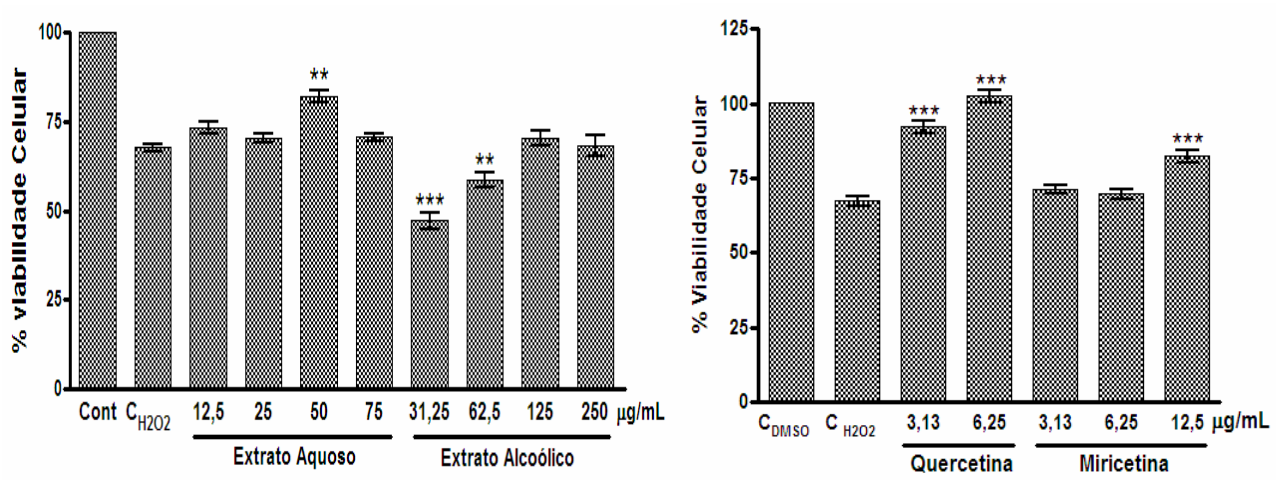


Figura 1b – Efeito agudo da atividade citoprotetora dos extratos aquoso e alcoólico das folhas de *E. uniflora* e da quercetina e miricetina após 1h de exposição celular. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média por método de variância ANOVA, onde ***$p < 0,001$, ** $p < 0,01$ quando comparados com grupo controle (C_{H2O2}) sob estresse oxidativo induzido por 150µM H_2O_2/2h. Resultados representativos de 2 experimentos independentes ($n \geq 8$).

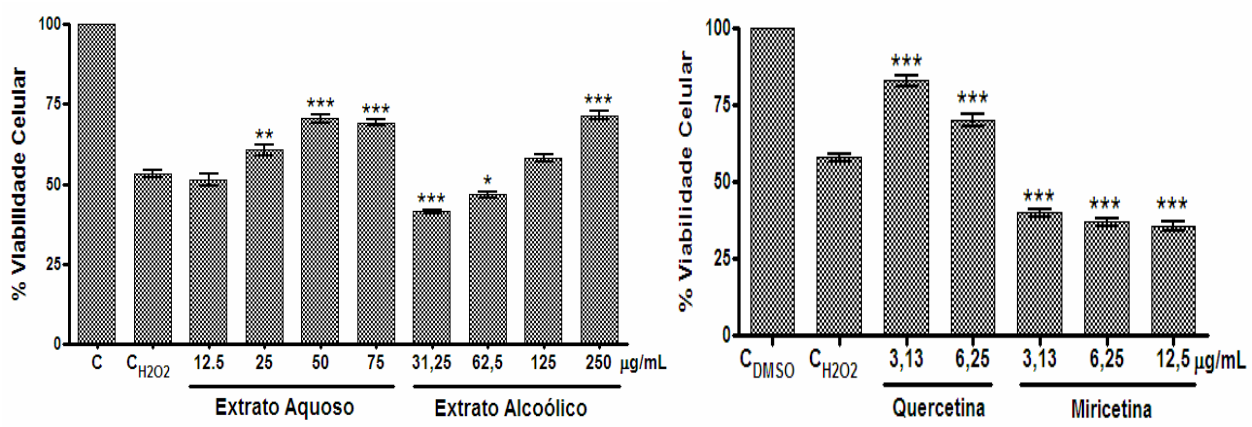


Figura 2b – Efeito crônico da atividade citoprotetora dos extratos aquoso e alcoólico das folhas de *E. uniflora* e da quercetina e miricetina após 24h de exposição celular. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média por método de variância ANOVA, onde *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e *$p < 0,05$ quando comparados com grupo controle (C_{H2O2}) sob estresse induzido por 150µM H_2O_2/2h. Resultados representativos de 2 experimentos independentes ($n \geq 8$).

Por fim, os mecanismos moleculares relacionados com o estresse oxidativo e sua contribuição aos danos teciduais e desenvolvimento das complicações do diabetes não estão totalmente elucidados. Em uma variedade de tecidos, inclusive em células β, a hiperglicemia e altas quantidades de ácidos graxos livres resultam em geração de ERO, levando ao aumento de estresse oxidativo. O desbalanço gerado leva a ativação de vias de sinalização intracelular sensíveis ao estresse oxidativo como a do NF-κB (MOHAMED et al., 1999; NISHIKAWA et al., 2000), JNK/SAPK (HO et al., 2000; NATARAJAN et al., 1999), hexosamina (DU et al., 2000), entre outras, que sabidamente estão relacionadas com disfunção e morte celular. A via do NF-κB, por exemplo, é uma das principais vias intracelulares ativadas por aumento da geração de espécies reativas em células β- pancreáticas. O NF-κB é um fator de transcrição que encontra-se inativo no citoplasma celular, devido ligação não-covalente com subunidades inibitórias denominadas IκBs. Espécies reativas podem estimular as proteínas quinases IKKα e IKKβ, responsáveis pela fosforilação das subunidades inibitórias de NF-κB. A fosforilação é um sinal para

poliubiquitinação e degradação das IκBs no complexo proteosomo 26S, estimulando assim a liberação e ativação da via do NF-κB. Este fator de transcrição, quando ativado, regula a expressão de genes específicos relacionados a resposta imune e inflamatória. Em células β- pancreáticas, o NF-κB ativo, entre outros efeitos, estimula o aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase, levando ao acúmulo de NO e consequente morte celular por apoptose e/ou necrose (HO; BRAY, 1999).

Flavonóides são descritos por protegerem células β- pancreáticas contra estresse oxidativo e ativação do NF-κB. Um dos mecanismos propostos consiste no bloqueio da degradação das proteínas inibidoras de NF-κB, as IκBs. No estudo realizado por Dias et al. (2005), a quercetina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e a ativação do NF-κB, por meio da inibição de IKKα e IKKβ, que são proteínas quinases fosforiladoras dos inibidores de NF-κB. Além de compostos isolados, extratos vegetais, tais como os extratos de *Coptidis rhizoma*, rico em alcalóides, e o de *Córtex cinnamomi*, rico em compostos fenólicos, também foram capazes de prevenir a ativação do NF-κB tanto *in vivo* (ratos diabéticos) quanto *in vitro* (RINm5f). Foi verificado que estes extratos inibem a ativação da via do NF-κB de duas formas: através do bloqueio da translocação do NF-κB para o núcleo celular e pela inibição da degradação das IκBα, respectivamente (KWON et al., 2006; KIM et al., 2007b).

Morfologia Celular

Espécies reativas de oxigênio, como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila podem destruir a integridade de células epiteliais (MCBRIDE; STONE; MARIN, 1993; YAMAYA et al., 1995; WATERS; SAVLA; PANOS, 1997; CHAPMAN; WATERS; MILLER, 2002). As células RINm5f apresentam características epiteliais, com grande adesão intercelular através de projeções citoplasmáticas que são mantidas por microfilamentos de actina. Células epiteliais normalmente

possuem córtex de actina subjacente à membrana responsável pelas movimentações celulares, importantes para a manutenção de suas funções fisiológicas. O formato celular é estrelado, núcleo arredondado e um citoplasma rico em componentes aniônicos, o que confere intensa coloração por hematoxilina. Esta característica advém do fato desta célula possuir um grande retículo granular devido à intensa produção de proteínas para exportação (insulina). As características celulares dos grupos controle contendo somente meio (Figura 3b e 5b) e contendo DMSO (Figura 4b e 6b), em ambos os ensaios (agudo e crônico), são idênticas.

Quando foi adicionada a solução de peróxido de hidrogênio, houve perda de adesão intercelular com alteração no formato das células (Figura 3b, 4b, 5b e 6b). Este se apresentou mais arredondado, indicando provável alteração nos elementos estruturais (polímeros de actina). Essa ruptura do citoesqueleto de actina (por despolimerização) pode levar a um aumento de permeabilidade e redução da seletividade de membrana (MEZA et al., 1982; MADARA; BARENBERG; CARLSON, 1986; STEVENSON; BEGG, 1994; PEREZ; BARBER; PONZ, 1997). Inclusive, a membrana plasmática de várias células apresentou aspecto irregular, com formação de pregas. O citoplasma estava mais claro, provavelmente por desestruturação de retículo endoplasmático granular, o que ocasionou em redução da basofilia e núcleo mais evidente, possivelmente por perda do conteúdo citoplasmático devido ao aumento da permeabilidade de membrana (peroxidação lipídica). Peroxidação lipídica está relacionada com modificações nos receptores de membrana, canais e transportadores iônicos, dentre outras proteínas de membrana. Isso leva a uma alteração da homeostase de Ca^{2+}, quinases dependentes de cálcio (proteases, nucleases e fosfolipases) levando a disfunção mitocondrial e ativando mecanismos de morte celular (BUTTERFIELD; LAUDERBACK, 2002; GYULKHANDANYAN; FEENEY; PENNEFATHER, 2003; JACOBSON; DUCHEN, 2002; ROBB et al., 1999). Além da peroxidação lipídica, o

citoesqueleto é um dos primeiros alvos do estresse oxidativo (DALLE-DONNE et al., 2001; ZHAO; DAVIS, 1998). Há uma gama crescente de evidências que suportam a hipótese de que perturbações nas proteínas do citoesqueleto estão relacionadas com a etapa inicial dos danos induzidos por oxidantes (ZHU et al., 2005). Efeito semelhante foi observado em células respiratórias epiteliais (Calu-3) em que o H_2O_2 induziu mudanças no citoesqueleto e diminuição da seletividade de membrana (BOARDMAN et al., 2004).

Quando do pré-tratamento com os extratos e compostos isolados, em ensaio crônico (24h), houve prevenção de alteração da morfologia pelo extrato aquoso (75µg/mL), extrato alcoólico (250µg/mL) e quercetina (3,13 e 6,25µg/mL). As células tratadas com extrato aquoso, extrato alcoólico e quercetina (3,13µg/mL) apresentaram forma arredondada, sem formação de pregas na membrana plasmática, basofilia citoplasmática semelhante ao controle e preservação das projeções citoplasmáticas (Figura 5b e 6b). Yoon et al. (2004) também obtiveram citoproteção da linhagem celular HIT-T15 quando do pré-tratamento com extrato aquoso de *Rheum undulatum* (24h), rico em compostos fenólicos, antes de exposição ao H_2O_2. As alterações celulares descritas por estes autores para o grupo exposto somente ao H_2O_2 foram principalmente, o encolhimento celular com condensação citoplasmática e formação de *blebs* citoplasmáticos com irregularidade na forma. As células tratadas com quercetina 6,25µg/mL apresentaram morfologia muito próxima a do controle, sem alterações nas interdigitações e apenas algumas células com formato arredondado (Figura 6b). Essas características observadas sugerem uma possível prevenção da peroxidação lipídica. Enfim, não foi observado efeito citoprotetor nas concentrações de 50 e 25µg/mL de extrato aquoso (Figura 5b).

No ensaio agudo (1h), houve prevenção de alteração da morfologia quando adicionado extrato aquoso (50µg/mL), quercetina (3,13µg/mL) e miricetina (12,5µg/mL). As células apresentaram forma arredondada, sem formação de pregas na membrana plasmática, basofilia citoplasmática semelhante ao controle e preservação das projeções citoplasmáticas (Figura 3b e 4b). Apesar da miricetina apresentar efeito citoprotetor, este se mostrou menos intenso que os demais. Em estudo feito por Lee, Yoon e Park (2008), células PC12 induzidas ao estresse oxidativo por H_2O_2 (500µM/2h) apresentaram morfologia do núcleo altamente condensada e fragmentada e encolhimento do núcleo. Quando estas células foram pré-tratadas com *Paeonia lactiflora* (30min), não houve alterações de núcleo e o número de células com condensação e fragmentação nuclear diminuiu. Kang et al. (2005) observaram que o extrato etanólico de raiz de *Puerariae* (100µg/mL/1h) diminuiu a fragmentação de núcleo em células V79-4 quando submetidas a H_2O_2 (1mM/24h). Em células endoteliais (HUVEC) mantidas em cultura, a adição de 200µM de H_2O_2 causou, de acordo com tempos variáveis de exposição, contração celular, desaparecimento de vimentina e tubulina (efeito agudo) e desorganização do citoesqueleto (efeito crônico) (VALEN et al., 1999). Segundo Anzuategui (2009), células RINm5f submetidas a estresse por H_2O_2 (100µM) e suco de maça Fuji, rico em quercetina, em ensaio agudo (1h), tiveram indícios de potencialização do efeito do H_2O_2, com retração citoplasmática (contração celular), menor interação intercelular e perda do aspecto característico (estrelado). Em contrapartida, essas células submetidas ao mesmo estresse (H_2O_2) e suco da maçã Gala (também rico em quercetina), apresentaram morfologia semelhante às células do controle sem peróxido.

No geral, não houve diferenças significativas do ponto de vista morfológico com os tratamentos agudo e crônico, exceto para o extrato aquoso. Com o extrato aquoso, no tratamento agudo, a concentração de 50µg/mL promoveu a mesma eficiência de proteção quanto a

concentração de 75µg/mL no tratamento crônico (Figura 3b e 5b). Estes resultados demonstram que 1h de exposição prévia é suficiente para que extratos e isolados penetrem nas células conferindo-lhes citoproteção, além da possível ação direta do extrato com o peróxido de hidrogênio no ensaio agudo.

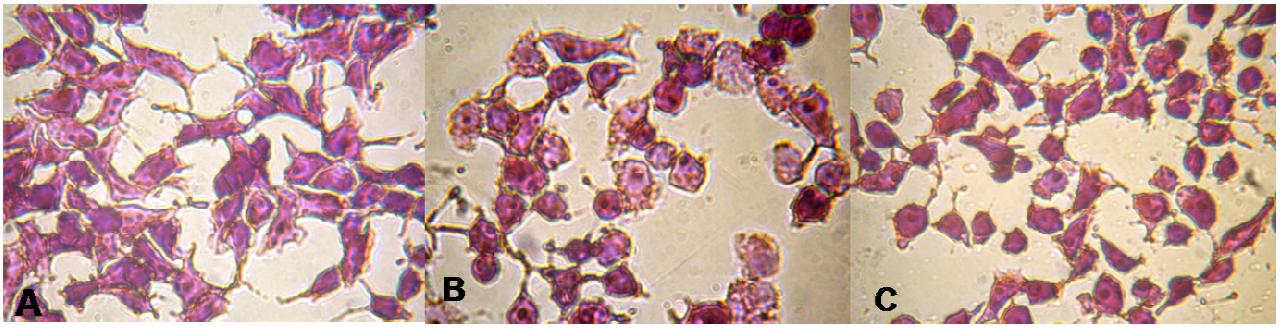


Figura 3b – Morfologia das células RINm5f com adição de 150µM H_2O_2/2h, exceto no controle (A) após pré-tratamento (1h) com extrato aquoso de folhas de *Eugenia uniflora* (C) na concentração de 50µg/mL. Controle com H_2O_2 (B). Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n=4). Aumento 800x.

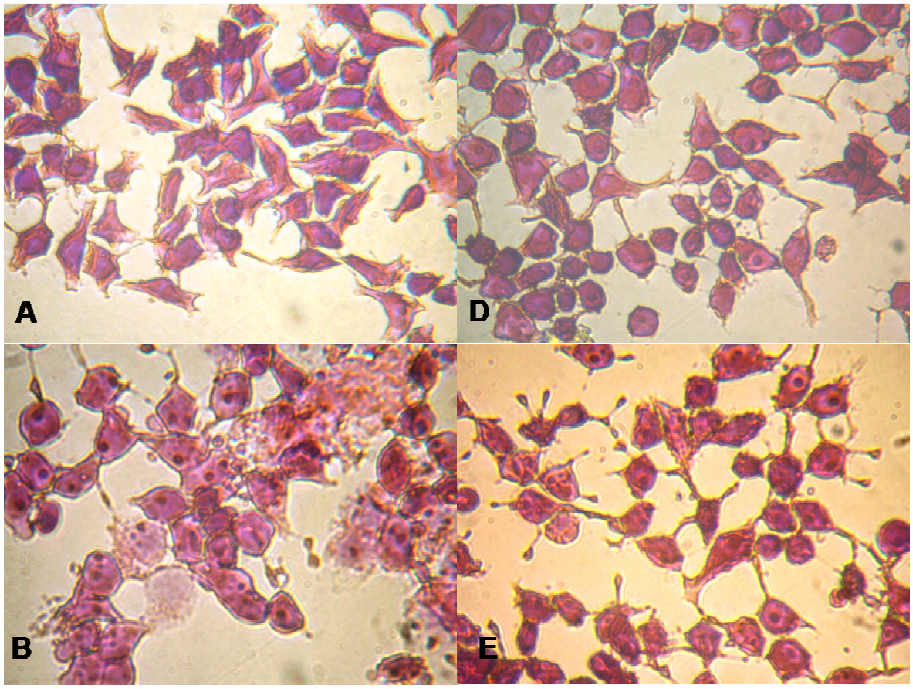


Figura 4b – Morfologia das células RINm5f com adição de 150µM H_2O_2/2h, exceto no controle DMSO (A) após pré-tratamento (1h) com quercetina 3,13µg/mL (D) e miricetina 12,5µg/ml (E). Controle com H_2O_2 (B). Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n =4). Aumento 800x.

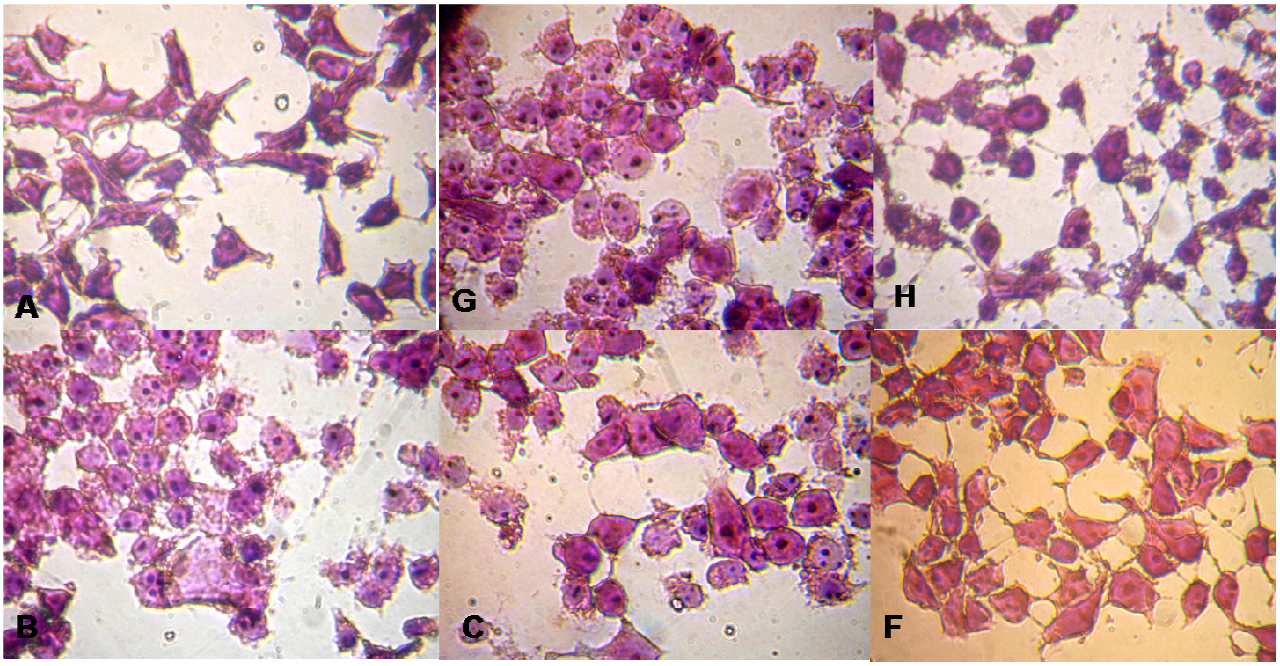


Figura 5b – Morfologia das células RINm5f com adição de 150µM H_2O_2/2h, exceto no controle (A) após pré-tratamento (24h) com os extratos aquoso 25µg/mL (G); 50µg/mL (C) e 75µg/mL (H) e alcoólico 250µg/mL (F) de folhas de *Eugenia uniflora*. Controle com H_2O_2 (B). Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n=4). Aumento 800x.

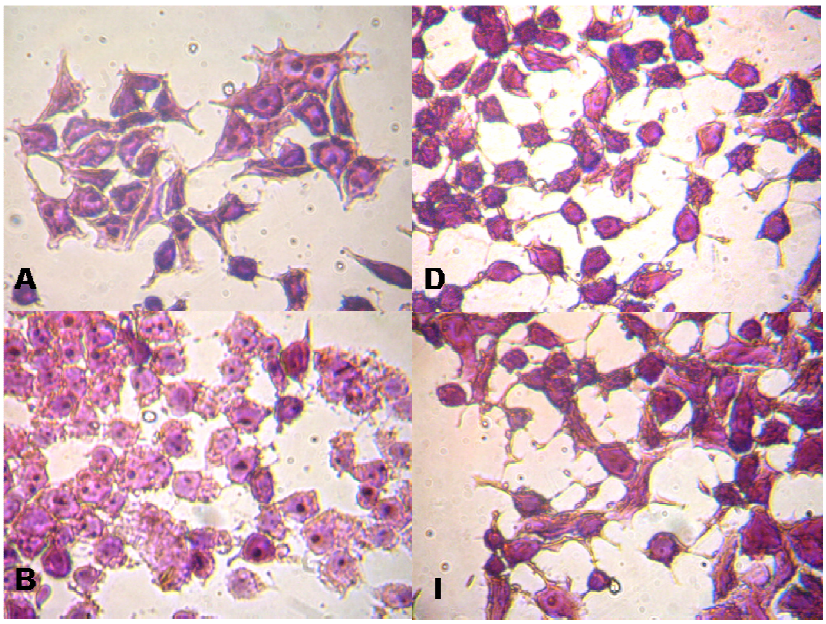


Figura 6b – Morfologia das células RINm5f com adição de 150µM H_2O_2/2h, exceto no controle DMSO (A) após 24h de exposição a quercetina 3,13µg/mL (D) e 6,25µg/mL (I). Controle com H_2O_2 (B). Resultados representativos de 2 experimentos independentes (n=4). Aumento 800x.

Western Blot

Neste trabalho, a expressão protéica da SOD não se apresentou diferente do controle para nenhum grupo tratado (Figura 7b). No estudo de Wei et al. (2003) foi observado redução dos níveis de mRNA para a SOD (30%) quando as células PC12 foram expostas a 100µM de H_2O_2 por 2h, entretanto a expressão protéica não foi avaliada. Kang et al. (2005) realizaram um estudo com células de fibroblastos (V79-4) onde esta linhagem foi tratada com extrato alcoólico de uma erva medicinal chinesa (*Puerariae radix*). Eles observaram aumento (tempo-dependente) na atividade das enzimas SOD e CAT, porém sem variação na expressão protéica destas enzimas.

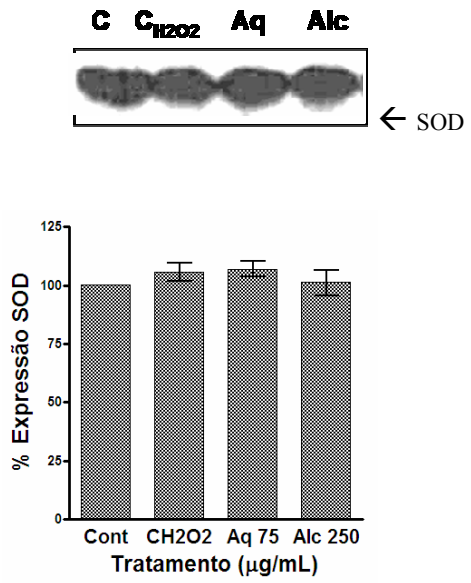


Figura 7b – Concentração protéica da SOD após exposição a peróxido de hidrogênio (2h) com tratamento prévio (24h) com extratos aquoso (Aq) 75µg/mL e alcoólico (Alc) 250µg/mL. Controle (Cont), controle com H_2O_2 (CH_2O_2). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média por método de variância ANOVA, referente a 3 experimentos independentes.

A expressão protéica da Bax não sofreu variação com o estresse oxidativo induzido por H_2O_2 (150 µM/2h) nem com a adição de nenhum dos tratamentos (Figura 8b). Isto indica que a disfunção mitocondrial (evidenciada pelo MTT) não causou aparente indução da cascata de apoptose nas células. Isto pode ser um indício de disparo de outro mecanismo de morte celular induzido pelo peróxido de hidrogênio, como por exemplo, necrose celular. Resultado semelhante foi obtido por Kimoto et al. (2003) após indução de estresse com H_2O_2 (150µM/3h) em células MIN6 na ausência ou presença de glicazida (sulfoniluréia com reconhecida atividade antioxidante). Santangelo et al. (2007) induziram estresse oxidativo com elevadas concentrações de ácidos graxos livres (72h exposição) em células secretoras de insulina (RINm5f) após prévia incubação destas em meio sem soro fetal bovino. Obtiveram como resultado que os ácidos graxos induzem uma redução significativa na expressão de Bcl-2, tanto em relação aos níveis de mRNA quanto em níveis protéicos. Por outro lado, não houve mudanças significativas nos níveis de expressão de mRNA e proteínas Bax.

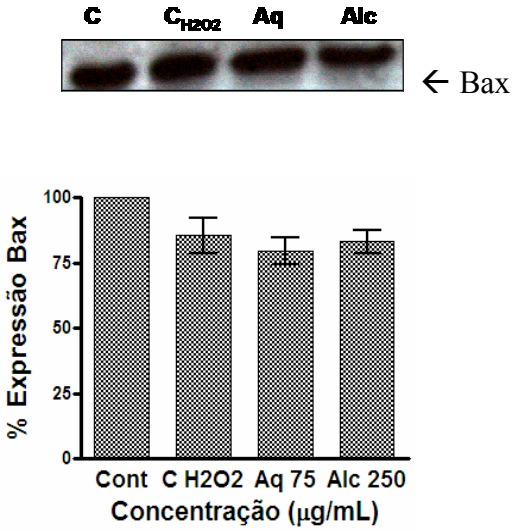


Figura 8b – Concentração protéica da Bax após exposição a peróxido de hidrogênio (2h) com tratamento prévio (24h) com extratos aquoso (Aq) 75µg/mL e alcoólico (Alc) 250µg/mL. Controle (Cont), controle com H_2O_2 (CH_2O_2). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média por método de variância ANOVA, referente a 5 experimentos independentes.

Durante condições de estresse celular, como por exemplo, aumento nos níveis de proteínas mal-enovealadas, é gerado estresse no retículo endoplasmático (RE). O sistema molecular intrincado para monitorar e responder as alterações de enovelamento das proteínas do retículo é chamado de "resposta a proteínas mal-enoveladas". Alterações neste processo levam a sobrecarga das chaperonas e o retículo endoplasmático falha em exportar as recém sintetizadas proteínas, podendo desencadear um processo de morte celular, como apoptose (FRANCO, 2009). Condições crônicas associadas com diabetes e obesidade como inflamação, hiperlipidemia e hiperglicemia têm sido indicadas como indutoras de estresse de retículo em vários tipos celulares (OZCAN et al., 2004). No diabetes, o estresse reticular está envolvido com a progressão da disfunção e morte celular, incluindo células β- pancreáticas (KANETO et al., 2006).

A expressão protéica da GRP94 e da PDI não sofreu variação com o estresse induzido por H_2O_2 150µM/2h tanto na ausência quanto na presença dos extratos (24h) (Figura 9b- A e C, respectivamente). Entretanto, a expressão da GRP78, responsável pela manutenção da permeabilidade da membrana do retículo endoplasmático, enovelamento de proteínas no retículo e pela ativação da resposta a proteínas mal-enoveladas, sofreu aumento de expressão em todos os grupos contendo H_2O_2. Além disso, o pré-tratamento com o extrato aquoso ou alcoólico não alterou este resultado (Figura 9b-B). Apesar das demais proteínas reticulares não terem apresentado variação, o aumento na expressão da GRP78 é um forte indicativo de que as células estão sob estresse reticular e que este aumento corresponde a uma resposta de defesa. Dorner, Wasley e Kaufman (1992) e Laybutt et al. (2007) verificaram que a superexpressão da GRP78 está relacionada com a proteção de células ovarianas de hamsters e de células MIN6 contra estresse de retículo e consequente apoptose.

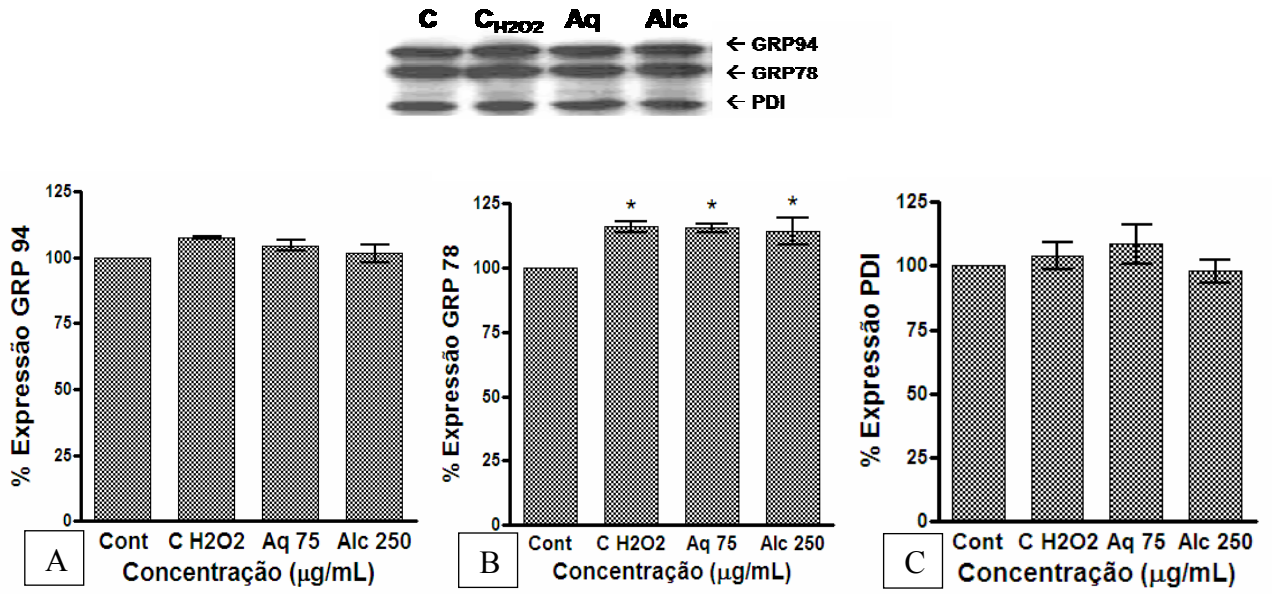


Figura 9b – Concentração protéica da GRP94 (A); GRP78 (B) e PDI (C) após exposição ao H_2O_2 (2h) com tratamento prévio (24h) com extratos aquoso (Aq) 75μg/mL e alcoólico (Alc) 250μg/mL. Controle (Cont), controle com H_2O_2 (CH_2O_2). Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média por método de variância ANOVA, onde $*p < 0,05$ referente a 3 experimentos independentes.

Em situação de diabetes, o estresse de retículo está aumentado em vários tecidos. Recentemente foi descrito que células pancreáticas submetidas a estresse oxidativo induzido por hiperglicemia crônica apresentam um aumento na expressão dos genes envolvidos com estresse de retículo, como por exemplo a GRP78 (WANG; KOURI; WOLLHEIM, 2005). Nakatani et al. (2005) encontraram a expressão de proteínas marcadoras de estresse de retículo muito aumentadas em fígado de camundongos (C57BL6) diabéticos comparados com os não diabéticos. Neste sentido, o estresse de retículo pode contribuir para a redução na expressão dos níveis de insulina quando há hiperglicemia (SHAN LAI, 2008).

Considerações finais

Espécies reativas são amplamente aceitas como fatores cruciais na progressão do diabetes e outras doenças. A citoproteção observada sugere que os compostos testados reduzam o estresse oxidativo, provavelmente por sua atividade antioxidante direta (efeito agudo) e indireta (efeito crônico), porém estes devem possuir vias de ação diferenciadas por não corresponderem aos mesmos compostos nem as mesmas concentrações. Além disso, o desbalanço gerado pelas espécies reativas leva a ativação de vias de sinalização intracelular como a do NF-κB, que contribui para as complicações do diabetes. Embora estes mecanismos não estejam ainda muito bem elucidados, extratos vegetais ricos em compostos fenólicos e flavonóides são descritos por inibirem a ativação do fator nuclear *κappa* B por meio do bloqueio da degradação de suas proteínas inibidoras (IκBs). Sendo assim, estes resultados são um indicativo de que o extrato de *Eugenia uniflora* L. possa ser utilizado na prevenção de danos sobre células secretoras de insulina e consequente desenvolvimento e/ou progressão de diabetes mellitus.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

5 Discussão Geral

Muitas plantas são usadas no Brasil na forma de extratos brutos, infusões ou emplastros como forma alternativa de tratamento para as mais diversas patologias sem nenhuma comprovação científica de sua eficácia e, principalmente, sem levar em consideração a sua toxicidade. Folhas de *Eugenia uniflora* L. têm sido amplamente utilizadas para o tratamento de diversas patologias, inclusive o diabetes mellitus. Por conta disso, extratos brutos (aquoso e alcoólico) das folhas de pitanga e dois compostos fenólicos comumente encontrados nestes extratos (quercetina e miricetina) foram testados quanto a sua capacidade antioxidante, citotóxica e citoprotetora.

A atividade antioxidante encontrada para os extratos aquoso e alcoólico das folhas de pitanga evidenciou a presença de compostos diferentes, o que refletiu em atividade antioxidante distinta. O resultado de baixa atividade antioxidante do extrato alcoólico não corroborou com os valores encontrados na literatura. Segundo Boscolo et al. (2007), o extrato alcoólico das folhas apresentou um IC50 de 245,46µg/mL. Entretanto, a forma de extração em ambos os estudos foi diferenciada, sem contar ainda com o longo tempo de extração realizado neste estudo que pode ter levado a perda de atividade antioxidante e estabilidade das estruturas dos flavonóides que compõem do extrato alcoólico. Já a atividade antioxidante da quercetina e da miricetina apresentou-se duas vezes maior que a do extrato aquoso. Deve-se levar em consideração o fato de que estes dois compostos são amplamente aceitos como bons *scavenger* de espécies reativas. Além disso, alguns flavonóides como a quercetina podem apresentar ação indireta, aumentando as defesas antioxidantes celulares por influenciar na transcrição gênica de enzimas antioxidantes e reforçando a capacidade antioxidante celular por poupar/proteger outros antioxidantes intracelulares.

A comprovação dos efeitos da pitanga se dá por meio da correlação de sua atividade antioxidante, citotóxica e citoprotetora. Embora compostos fenólicos tipicamente atuem como antioxidantes, com propriedade citoprotetora, em determinadas condições podem agir como pró-oxidantes. Lapidot, Michael e Kanner (2002) descrevem que o comportamento dos flavonóides ou ácidos fenólicos como antioxidante ou pró-oxidante depende da natureza do estresse oxidativo. Um exemplo é a genisteína que modula a apoptose em células β e em ilhotas pancreáticas quando doses baixas de 25µg/L desta reduziram a apoptose induzida por NaF enquanto que altas doses (100µg/L) a causaram (ELLIOTT; SCARPELLO; MORGAN, 2002). Além disso, vale a pena ressaltar que a citotoxicidade de um determinado flavonóide varia muito de acordo com a susceptibilidade de cada tipo celular. Nos resultados obtidos, as concentrações mais altas testadas para quercetina, miricetina e o extrato aquoso nas células β- pancreáticas foram citotóxicas enquanto doses mais baixas não interferiram na viabilidade/proliferação celular, exceto na concentração de 31,5µg/mL do extrato alcoólico (aumento de proliferação) e de 12,5µg/mL de quercetina (diminuição de proliferação). Aherne e O'Brien (1999) observaram que mesmo doses bem elevadas (0-200µM) de miricetina, quercetina e rutina, por 24h, não induziram comprometimento da viabilidade celular de células Caco-2 e Hep G2. Além disso, dados da literatura mostram que flavonóides podem ter efeito proliferativo e antiproliferativo. Avila et al. (1994) encontraram que a quercetina inibe a proliferação celular de uma linhagem de células de câncer de mama (MDA-MB468). Entretanto, Vessal, Hemmati e Vasei (2003) descreveram aumento significativo no número de ilhotas pancreáticas em ratos diabéticos e não-diabéticos quando tratados com quercetina. Eles justificam que este aumento possa ser devido à replicação de DNA aumentada nestas células. Sendo assim, depois da perda de células β-pancreáticas tanto na diabetes tipo 1 quanto na tipo 2, pode ocorrer regeneração (TOURREL et al., 2002; MEIER et al., 2005).

Diversos estudos relacionam o efeito de extratos vegetais e flavonóides com o desenvolvimento de diabetes e descrevem que vários desses compostos têm apresentado a capacidade de normalizar a absorção de glicose e a produção e armazenamento de insulina tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Contudo, estes resultados ainda são muito controversos. Exemplos dessa diversidade de resultados são os estudos com os flavonóides genisteína e resveratrol. Autores afirmam que estes compostos em determinadas concentrações aumentam a secreção de insulina enquanto que em outras concentrações a inibem (PERSAUD et al., 1999; OHNO et al., 1993; CHEN et al., 2007). Em estudos *in vivo* com quercetina, Vessal, Hemmati e Vasei (2003) demonstraram que a suplementação com este flavonól foi eficiente na diminuição da glicose sanguínea. Estes autores ainda sugeriram que a diminuição da glicemia em ratos possa ter ocorrido por aumento da secreção de insulina induzida por quercetina; entretanto não foi analisado um efeito direto sobre o pâncreas endócrino e portanto, este efeito pode ter ocorrido por redução da digestão intestinal de carboidratos e gorduras (ARAI et al., 1999) e / ou aumento na ação periférica da insulina (hepática e muscular). A partir dos resultados obtidos neste estudo, tanto a quercetina quanto a miricetina não afetam a secreção deste hormônio, exceto na concentração de 3,13µg/mL de miricetina onde foi verificado efeito inibitório.

Além dos compostos isolados, vários estudos também vêm sendo desenvolvidos para avaliar o efeito de extratos vegetais ricos em polifenóis sobre a glicemia e secreção de insulina. Sharma et al. (2006) testaram os extratos aquoso e alcoólico dos frutos de uma planta popularmente utilizada para tratamento de diabetes, também pertencente ao gênero *Eugenia*, denominada *E. jambolana* e obtiveram como resultado que os extratos tiveram efeito hipoglicêmico, sendo o aquoso mais eficiente. Posteriormente, testaram uma fração do extrato aquoso desta planta e encontraram que esta estimulou significativamente a secreção de insulina. A

propósito, alguns estudos realizados *in vivo* com extrato de folhas de *E. uniflora* demonstraram eficiente ação deste na redução da glicemia, porém o mecanismo de ação deste extrato sobre o controle glicêmico permanece incerto, com indicativos de que este atue de forma mais intensa na digestão intestinal de carboidratos e gorduras. Momose (2000) e Matsumura et al. (2000) atribuíram o efeito hipoglicemiante à atividade inibitória do extrato das folhas de pitanga sobre enzimas intestinais, como as α – glicosidases, maltase e sucrase. Além da inibição da digestão de açúcares, também é atribuída aos extratos de pitanga a redução na absorção intestinal de gorduras, o que pode ser eficiente no tratamento de diabetes e obesidade (ARAI et al., 1999). Apesar de estudos sugerindo mecanismos hipoglicemiantes da *E. uniflora*, não havia estudos relacionando a ação direta desta sobre as células secretoras de insulina. A partir da avaliação do efeito dos extratos de folhas de *E. uniflora* sobre a secreção de insulina em células RINm5f, foi possível verificar que, diferentemente dos resultados obtidos com *E. jambolana*, o extrato aquoso de folhas de *E. uniflora* não apresentou efeito significativo na secreção de insulina. Entretanto, o extrato alcoólico aumentou expressivamente a secreção de insulina quando comparado com o controle. Sabidamente a proteção antioxidante é um dos mecanismos possíveis de estimulação da secreção de insulina. A partir da análise do extrato alcoólico, foi verificado que este apresenta um conteúdo total de compostos fenólicos e atividade antioxidante muito menores quando comparado ao extrato aquoso. Neste sentido, a atividade antioxidante não parece ser o mecanismo insulinotrópico do extrato alcoólico. É importante ressaltar que a ação insulinotrópica dos flavonóides não se restringe a sua ação antioxidante, podendo estar, mesmo que em baixa concentração, relacionado à secreção de insulina a partir da interação com proteínas, modulação de cascatas intracelulares e modulação da expressão gênica (PINENT et al., 2008). Em linhagens de células secretoras de insulina, por exemplo, a genisteína estimula a secreção de insulina através do acúmulo intracelular de AMPc e

ativação da enzima proteína quinase A (LIU et al., 2006). Já flavonóides derivados do chá verde, tais como a epigalocatequina-3-galato (EGCG) e epicatequina 3-galato (ECG) atuam como secretagogos de insulina a partir da inibição dos canais de potássio sensíveis a ATP, promovendo a despolarização das células β- pancreáticas e consequente exocitose dos grânulos de insulina (PINENT et al., 2008). Sendo assim, compostos especificamente extraídos na fase alcoólica podem ser os responsáveis pela ação insulinotrópica do extrato de pitanga, interferindo em mecanismos fisiológicos e desta forma estimulando a liberação de insulina. Além de flavonóides, terpenos, íons e ácidos orgânicos podem ser extraídos a partir de folhas e merecem ser melhor investigados.

Quando as células RINm5f foram induzidas ao estresse oxidativo (H_2O_2), em exposição aguda, danos celulares foram prevenidos pelo extrato aquoso. Lee, Yoon e Park (2008) também obtiveram efeito protetor do pré-tratamento (30min) com uma erva medicinal (*Paeonia lactiflora*) sobre células derivadas de feocromocitoma (tumor de medula adrenal) de ratos induzidas a estresse oxidativo por H_2O_2 (500µM/2h). Este promoveu um aumento de viabilidade celular de 5-30%, de forma dose-dependente, quando comparado com grupo contendo somente H_2O_2. Os compostos isolados também promoveram significativo efeito citoprotetor. A citoproteção conferida pela miricetina foi observada apenas na concentração de 12,5µg/mL, enquanto que a quercetina apresentou um resultado dose-dependente, onde a concentração de 6,25µg/mL conferiu total proteção (100%) contra o peróxido de hidrogênio. Assim como observado neste trabalho, Sestili et al. (1998) obtiveram resultado de citoproteção às células U937 pela quercetina, de maneira dose-dependente, quando submetidas a estresse oxidativo por *tert*-butil-hidroperóxido (*t*B-OOH – 3mM) na ausência e presença de diferentes concentrações deste flavonól.

No ensaio crônico, os extratos promoveram melhor citoproteção entre maiores concentrações testadas. O extrato aquoso manteve a viabilidade celular em média 16,5% maior que quando comparado com controle H_2O_2, porém concentrações baixas do extrato alcoólico potencializaram o efeito do indutor de estresse. Resultado semelhante foi descrito com extrato aquoso de *Rheum undulatum* que parcialmente protegeu células β- pancreáticas (HIT-T15) submetidas a estresse oxidativo com 100µM de H_2O_2 (YOON et al., 2004). Já com relação aos compostos isolados, a quercetina demonstrou significativo efeito citoprotetor. Efeito protetor pela quercetina também foi verificado por Coskun et al. (2005) quando o pré-tratamento com esta diminui a peroxidação lipídica e a formação de óxido nítrico, além de ter aumentado a atividade de enzimas antioxidantes em ratos induzidos a diabetes. No que diz respeito a miricetina, todas as concentrações potencializaram o efeito do H_2O_2. Vários estudos demonstram que compostos fenólicos, sob certas condições, podem apresentar efeito pró-oxidante. Esta condição está normalmente associada com concentrações relativamente elevadas desses compostos. Neste sentido, Canada et al. (1990) descreveram que a miricetina sofre auto-oxidação em tampão aquoso de forma a produzir H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$. Além disso, quando incubada com Fe^{2+} na presença e ausência de H_2O_2, a miricetina é capaz de aumentar a produção de OH^-. Foi sugerido que, quando não adicionado H_2O_2, a auto-oxidação da miricetina produz H_2O_2 que reage com o ferro gerando OH^- (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994).

Os mecanismos moleculares relacionados com o estresse oxidativo e sua contribuição aos danos teciduais e desenvolvimento das complicações do diabetes não estão totalmente elucidados. Em uma variedade de tecidos, inclusive em células β, a hiperglicemia e altas quantidades de ácidos graxos livres resultam em geração de ERO, levando ao aumento de estresse oxidativo. O desbalanço gerado leva a ativação de vias de sinalização intracelular sensíveis ao estresse oxidativo

que estão relacionadas com disfunção e morte celular. A via do NF-κB, por exemplo, é uma das principais vias intracelulares ativadas por aumento da geração de espécies reativas em células β-pancreáticas. Espécies reativas podem estimular as proteínas quinases IKKα e IKKβ, responsáveis pela fosforilação das subunidades inibitórias de NF-κB, denominadas IκBs, levando a ativação deste fator nuclear. Em células β- pancreáticas, a ativação do NF-κB leva ao aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase, levando ao acúmulo de NO e consequente morte celular por apoptose e/ou necrose. (HO; BRAY, 1999).

Flavonóides são descritos por protegerem células β- pancreáticas contra estresse oxidativo e ativação do NF-κB. Um dos mecanismos propostos consiste no bloqueio da degradação das proteínas inibidoras de NF-κB. No estudo realizado por Dias et al. (2005), a quercetina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e a ativação do NF-κB, por meio da inibição de IKKα e IKKβ, proteínas quinases fosforiladoras das IκBs. Além de compostos isolados, extratos vegetais, tais como os extratos de *Coptidis rhizoma*, rico em alcalóides, e o de *Córtex cinnamomi*, rico em compostos fenólicos, também foram capazes de prevenir a ativação do NF-κB tanto *in vivo* (ratos diabéticos) quanto *in vitro* (RINm5f). Foi verificado que estes extratos inibiram a ativação da via do NF-κB de duas formas: através do bloqueio da translocação do NF-κB para o núcleo celular e pela inibição da degradação das IκBα, respectivamente (KWON et al., 2006; KIM et al., 2007b).

O peróxido de hidrogênio causa alterações morfológicas drásticas nas células RINm5f. Estas alterações indicam perda de adesão intercelular com alteração no formato celular (mais arredondado). Isto sugere provável alteração nos elementos estruturais (polímeros de actina) podendo levar a um aumento de permeabilidade de membrana e redução da seletividade de membrana (MEZA et al., 1982; MADARA; BARENBERG; CARLSON, 1986; STEVENSON;

BEGG, 1994; PEREZ; BARBER; PONZ, 1997). A membrana plasmática de várias células apresentou aspecto irregular, com formação de pregas e citoplasma mais claro por provável desestruturação de retículo endoplasmático granular. Isto ocasionou redução da basofilia ficando o núcleo mais evidente, possivelmente por perda do conteúdo citoplasmático devido ao aumento da permeabilidade de membrana (peroxidação lipídica). Além da peroxidação lipídica, o citoesqueleto é um dos primeiros alvos do estresse oxidativo (DALLE- DONNE et al., 2001; ZHAO; DAVIS, 1998). Há uma gama crescente de evidências suportando a hipótese de que perturbações nas proteínas do citoesqueleto são o passo inicial dos danos induzidos por oxidantes (ZHU et al., 2005). Efeito semelhante foi observado em células respiratórias epiteliais (Calu-3) em que o peróxido de hidrogênio induziu mudanças no citoesqueleto e diminuição da seletividade de membrana (BOARDMAN et al., 2004).

Depois de exposição aos tratamentos ao ensaio crônico, o extrato aquoso, alcoólico e a quercetina preveniram alterações da morfologia. Isso sugere uma possível inibição da peroxidação lipídica. No ensaio agudo, houve prevenção de alteração da morfologia quando adicionado extrato aquoso, quercetina e miricetina. Apesar da miricetina apresentar efeito citoprotetor, este se mostrou menos intenso que os demais. Em estudo feito por Lee, Yoon e Park (2008), células PC12 induzidas ao estresse oxidativo por H_2O_2 (500µM/2h) apresentaram morfologia do núcleo altamente condensada e fragmentada com encolhimento do núcleo. Quando estas células foram pré-tratadas com *Paeonia lactiflora* (30min), não houve alterações de núcleo e o número de células com condensação e fragmentação nuclear diminuiu. Células endoteliais (HUVEC) mantidas em cultura, submetidas a 200µM de H_2O_2 tiveram contração celular, desaparecimento de vimentina e tubulina (efeito agudo) e desorganização do citoesqueleto (efeito crônico) (VALEN et al., 1999). Segundo Anzuategui (2009), células RINm5f submetidas a estresse por H_2O_2 (100µM) e exposição

aguda com suco de maça Fuji, rico em quercetina, tiveram potencialização do efeito do peróxido de hidrogênio, com retração citoplasmática (contração celular), menor interação intercelular e perda do aspecto característico (estrelado). Em contrapartida, quando as células foram submetidas ao suco da maçã Gala, na presença de H_2O_2, apresentaram morfologia semelhante às do controle sem peróxido.

Em geral, não houve diferenças significativas do ponto de vista morfológico com os tratamentos agudo e crônico, exceto para o extrato aquoso. A concentração 50µg/mL de extrato aquoso, no tratamento agudo, teve a mesma eficiência de proteção quanto a concentração de 75µg/mL no tratamento crônico. Estes resultados demonstram que 1h de exposição prévia é suficiente para que extratos e isolados penetrem nas células conferindo-lhes citoproteção, além da possível ação direta do extrato sobre o peróxido de hidrogênio (ensaio agudo).

Em uma tentativa de compreender melhor o estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio, foi avaliada ainda a expressão de algumas proteínas na presença de ambos os extratos. A primeira delas é a SOD, capaz de converter ânions superóxido em peróxido de hidrogênio. Posteriormente, pela ação de outras enzimas (CAT e GSHPx), o peróxido é convertido em moléculas mais estáveis sendo importante na proteção celular a estresse oxidativo. A não variação na expressão desta enzima corrobora com o trabalho realizado por Kang et al. (2005) no qual eles utilizaram células de fibroblastos (V79-4) previamente tratadas com extrato alcoólico de uma erva medicinal chinesa (*Puerariae radix*), as induziram a estresse oxidativo por H_2O_2 (1mM) e observaram um aumento (tempo-dependente) na atividade das enzimas SOD e CAT, porém sem variação na expressão protéica destas enzimas.

A segunda delas é a Bax, que não sofreu variação com o estresse oxidativo induzido por H_2O_2. Isto indica que a disfunção mitocondrial (evidenciada pelo MTT) não causou aparente indução da cascata de apoptose nesta linhagem celular. Isto pode ser um indício de disparo de outro mecanismo de morte celular induzido pelo peróxido de hidrogênio, como, por exemplo, necrose celular. Resultado semelhante foi obtido por Kimoto et al. (2003) após indução de estresse com H_2O_2 (150µM/3h) em células MIN6 na ausência ou presença de glicazida (sulfoniluréia com reconhecida atividade antioxidante). Além disso, Santangelo et al. (2007) induziram estresse oxidativo com elevadas concentrações de ácidos graxos livres em células secretoras de insulina (RINm5f) após prévia incubação destas em meio sem soro fetal bovino. Obtiveram como resultado que os ácidos graxos induzem uma redução significativa na expressão de Bcl-2, tanto em relação aos níveis de mRNA quanto em níveis protéicos. Por outro lado, sem mudanças significativas nos níveis de expressão de mRNA e proteínas Bax.

Por último, foram avaliadas algumas proteínas que correspondem a marcadores de estresse de retículo endoplasmático (RE). Durante condições de estresse celular, como por exemplo, aumento nos níveis de proteínas mal-enovealadas, é gerado estresse no retículo endoplasmático. Isto acarreta na falha do RE em exportar suas proteínas recém-sintetizadas, podendo desencadear o processo de apoptose (FRANCO, 2009; KANETO et al., 2006). Este processo é acompanhado de um aumento na expressão de proteínas reticulares, tais como GRP94 e GRP78 (proteínas reguladas por glicose) e PDI (dissulfito isomerase). Sabe-se que condições crônicas associadas com diabetes e obesidade, como níveis baixos de inflamação, hiperlipidemia e hiperglicemia, têm sido indicadas como indutores de estresse de retículo em vários tipos celulares (OZCAN et al., 2004). No diabetes, o estresse reticular está envolvido com a progressão da disfunção e morte celular, inclusive de células β- pancreáticas (KANETO et al., 2006). Nos resultados obtidos neste trabalho,

a expressão protéica da GRP94 e da PDI não sofreu variação com o estresse induzido por H_2O_2. Entretanto, a expressão da GRP78, responsável pela manutenção da permeabilidade de membrana do retículo endoplasmático, enovelamento de proteínas no retículo e pela ativação da resposta a proteínas mal-enoveladas, sofreu aumento em sua expressão em todos os grupos contendo H_2O_2, sendo que o pré-tratamento com o extrato aquoso e alcoólico não alterou este resultado. Apesar das demais proteínas reticulares não terem apresentado variação, o aumento na expressão da GRP78 é um forte indicativo de que as células estão sob estresse reticular e que este aumento corresponde a uma resposta de defesa. Dorner, Wasley e Kaufman (1992) e Laybutt et al. (2007) verificaram que a superexpressão da GRP78 está relacionada com a proteção de células ovarianas de hamsters e de células MIN6 contra estresse de retículo e consequente apoptose. Recentemente foi descrito que células pancreáticas submetidas a estresse oxidativo induzido por hiperglicemia crônica apresentam um aumento na expressão dos genes envolvidos com estresse de retículo, como por exemplo a GRP78 (WANG; KOURI; WOLLHEIM, 2005). Sendo assim, o estresse de retículo pode contribuir para a redução na expressão dos níveis de insulina quando há hiperglicemia (SHAN LAI, 2008).

6 Considerações finais

Neste estudo, conclui-se que os extratos brutos, aquoso e alcoólico, apresentam baixa toxicidade e variado grau de atividade antioxidante. O extrato aquoso, apesar de significativa ação antioxidante, não teve efeito frente à funcionalidade celular. Já o extrato alcoólico, embora não tendo apresentado importante efeito como antioxidante, demonstrou elevado potencial no tratamento alternativo do diabetes mellitus devido ao seu significativo efeito insulinotrópico. Este possivelmente não seja resultado da ação antioxidante, podendo estar relacionado com a interação com proteínas, modulação de cascatas intracelulares e/ou modulação da expressão gênica, uma vez que o extrato alcoólico apresentou baixo conteúdo de compostos fenólicos e atividade oxidante.

Espécies reativas são amplamente aceitas como fatores cruciais na progressão do diabetes e outras doenças. A citoproteção observada sugere que os compostos testados reduzam o estresse oxidativo, provavelmente por sua atividade antioxidante direta (efeito agudo) e indireta (efeito crônico), porém estes devem possuir vias de ação diferenciadas por não corresponderem aos mesmos compostos nem as mesmas concentrações. Além disso, o desbalanço gerado pelas espécies reativas leva a ativação de vias de sinalização intracelular como a do NF-κB, que contribui para as complicações do diabetes. Embora estes mecanismos não estejam ainda muito bem elucidados, extratos vegetais ricos em compostos fenólicos e flavonóides são descritos por inibirem a ativação do fator nuclear *κappa* B por meio do bloqueio da degradação de suas proteínas inibidoras (IκBs).

Sendo assim, estes resultados são um indicativo de que o extrato de *Eugenia uniflora* L. possa ser utilizado na prevenção de danos sobre células secretoras de insulina e consequente desenvolvimento e/ou progressão de diabetes mellitus.

7 Referências Bibliográficas

ADA (American Diabetes Association). Type 2 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care**, v.23, p.381-389, 2000.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Protection by the flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, against hydrogen peroxide-induced DNA damage in Caco-2 and HepG2 cells. **Nutr. Cancer**, v. 34, p.160– 166, 1999.

AHMED, E-A. A. T.; FATANI, A.J. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. **Pharmacol Res**, v.52, n.3, p.264–70, 2005.

AKHLAGHI, M.; BANDY, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.46, p.309–317, 2009.

ALMEIDA, E.C. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Pública,** v. 29, p.428- 433, 1995.

ALVES, T.M.A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants**. Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, p.367-373, 2000.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, p.103-108, 1996.

ANZUATEGUI, L.S.Y. **Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante da maçã em células pancreáticas submetidas à elevada concentração de glicose**, 2008, 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

ARAI, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.307–314, 1999.

ATCC. Disponível em: http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/Product Details/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-11605&Template=cellBiology. Acesso em: 06 jan. 2010.

AURICCHIO, M.T. Atividades antimicrobiana, antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, p.76-81, 2007.

AVILA, M.A. et al. Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Cancer Res**., v.54, n.9, p.2424-8, 1994.

BANDONI, A.L. et al. Survey of argentine medicinal plants. I. Folk-fore and phytochemical screening. **Lloydia,** v.35, p.69-80, 1972.

BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v.48, p.1–9, 1999.

BELL, G.I.; POLONSKY, K.S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in *β*-cell function. **Nature***, v.*414, p.788–791, 2001.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr**, v.12, p.123, 1999.

BOARDMAN, K. et al. Actin Re-Distribution in Response to Hydrogen Peroxide in Airway Epithelial Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.199, p.57–66, 2004.

BONDAN, C. **Perfil oxidativo de eritrócitos de bovinos intoxicados por *Senecio sp*.** 2006, 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria-RS, 2006.

BONGIOLO, A.M. **Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia uniflora* l. (myrtaceae) sobre a hiperglicemia e dislipidemia de ratos diabéticos induzidos por aloxana**, 2008, 54f. Dissertação (Mestre em Ciências da Saúde). Universidade do Extremo Sul Catarinense- UNESC, Criciúma-SC, 2008.

BOSCOLO, O.H. et al. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu, v.9, n.1, p.8-12, 2007.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**., v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes,** v.54, p.1615–1625, 2005.

BUTTERFIELD, D. A.; LAUDERBACK, C. M. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid □-peptide-associated free radical oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med**., v.32, p.1050-1060, 2002.

CANADA, A. T. et al. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. **Free Radical Biol. Med**., v.9, p.441-449, 1990.

CAO, G. et al. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. **American Journal of Clinical Nutrition,** v.68, p.1081-1087, 1998.

CAVALCANTE, F. L. M. Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FESBE), Caxambu, Brasil, 1988.

CHAPMAN, K.E.; WATERS, C.M.; MILLER, W.M. Continuous exposure of airway epithelial cells to hydrogen peroxide: Protection by KGF. **J Cell Physiol**, v.192, n.1, p.71–80, 2002.

CHEN, Z.Y. et al. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. **Chemistry and Physics of lipids**, v.79, p.157-163, 1996.

CHEN, W.P. et al. Resveratrol enhances insulin secretion by blocking K(ATP) and K(V) channels of beta cells. **Eur J Pharmacol**., v.30, p.269-77, 2007.

COENTRÃO, P.de A.M. **Avaliação de três técnicas de isolamento de polifenóis: aplicação em amostras de chocolate meio amargo**. 2005, 111f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2005.

CONSOLINI, A.E.; BALDINI, O.A.N.; AMAT, A.G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal of Ethnopharmacology,** v.66, p.33-39, 1999.

CONSOLINI, A.E.; SARUBBIO, M.G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.57- 63, 2002.

COSKUN, O. et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Pharmacol Res**, v.51, n.2, p.117–23, 2005.

COSTA, R. L.F.B.P. et al. Metabolic and functional changes in lymphocytes and macrophages as induced by ageing. **Physiol & Behav**., v. 53, p. 651-656, 1993.

COTELLE, A.C. Antioxidant proprieties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, n.91, p.35-43, 1996.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann Ist Super Sanità**, v.43, n.4, p.348-361, 2007.

DALLE-DONNE, I. et al. The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. **Free Radic. Biol. Med**., v.31, p.1624-1632, 2001.

DI STASI, L.C. et al. **Plantas Medicinais da Amazônia**. São Paulo: Ed.UNESP, 1989, p. 127.

DI STASI, L.C. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v.65, p.529-540, 1994.

DIAS, A.S. et al. Quercetin decreases oxidative stress, NF-κB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **The Journal of Nutrition**, v.135, p.2299–2304, 2005.

DORNER, A.J.; WASLEY, L.C.; KAUFMAN, R.J. Overexpression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. **EMBO J***,* v.11,n.4, p.1563-71, 1992.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v.43, n.2, p.460-472, 1983.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v.82, p.47–95, 2002.

DU, X. L. et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, p. 12222-12226, 2000.

DYPBUKT, J. M. et al. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells – The role of intracellular polyamines. **J. Biol. Chem**, v.269**,** p.30553–30560, 1994.

EBERHARDT, M. V.; LEE, C. Y.; LIU, R. H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v.405, p.903-904, 2000.

EL-ALFY, A.T.; AHMED, A.A.E.; FATANI, A.J. Protective effect of red grape seeds proantho-cyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. **Pharmacol Res**, v.52, n.3, p.264–70, 2005.

ELATTAR, T. M.; VIRJI, A. S. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. **Anticancer Res**. v.19, p.5407-5414, 1999.

ELLIOTT, J.; SCARPELLO, J.; MORGAN, N. Differential effects of genistein on apoptosis induced by fluoride and pertussis toxin in human and rat pancreatic islets and RINm5F cells. **J Endocrinol**, v.172, n.1, p.137–43, 2002.

EVANS, J.L. et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and *β*-cell dysfunction? **Diabetes,** v.52, p.1–8, 2003.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v.43, n.1, p.61-8, 1997.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. **Fd Chem. Toxic**. v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FOTSIS, T. et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. **Cancer Res**, v.57:2916–21, 1997.

FRANCO, S. **O estresse no retículo endoplasmático e a diabetes**. Disponível em:<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos%20DI%20PDF/Sara%20-%20Stress.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2009.

FRIDLYAND, L.E.; PHILIPSON, L.H. Oxidative reactive species in cell injury: Mechanisms in diabetes mellitus and therapeutic approaches. **Ann N Y Acad Sci***,* v.1066, p.136–151, 2005.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical – An endogenous toxicant. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol***,* v.23**,** p.239–257, 1983.

FU-LIANG, X. et al. Puerarin protects rat pancreatic islets from damage by hydrogen peroxide. **European Journal of Pharmacology**, v.529, p.1–7, 2005.

GALATI, G. et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v.177, 91- 104, 2002.

GALHIANE, M. S. et al. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta** v.70, p.286–292, 2006.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, v.7, n.1/ 2, p.113-174, 1998.

GHAFFARI, M.A.; MOJAB, S. Influence of flavonols as *in vitro* on low density lipoprotein glycation. **Iranian Biomedical Journal,** v.11, p.185-191, 2007.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.,** São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Products Report**, v.4, p.265-72, 1996.

GREENMAN, I.C. et al. Distinct glucose-dependent stress responses revealed by translational profiling in pancreatic *β*-cells. **J Endocrinol**, v.192, p.179–187, 2007.

GUPTA, S.S.; SETH, C.B. Effect of *Momordica charantia* Linn. (Karela) on glucose tolerance in albino rats. **J. Indian Med. Assoc**, v.39, p.581–584, 1962.

GYULKHANDANYAN, A. V.; FEENEY, C. J.; PENNEFATHER, P. S. Modulation of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species production by copper in astrocytes. **J. Neurochem**. v.87, p.448-460, 2003.

HALLIWELL, B. et al. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B. **Oxygen radicals and disease process**. Holanda: Hardwood Academic Publishers, p. 1–14, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease – an overview. **Methods Enzymol**, v.186**,** p.1–185, 1990.

HAN, M-K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic β-cell damage. **Experimental and Molecular Medicine**, v.35, n.2, p.136-139, 2003.

HANASAKI, Y.; OGAWA. S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biol. Med**., v.16, p.845-850, 1994.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HO, E.; BRAY, T.M. Antioxidants, NFκB Activation, and Diabetogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.205-213, 1999.

HO, F. M. et al. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. **Circulation,** v. 101, p. 2618-2624, 2000.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97(7), p.1027-1031, Out 2002.

HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology,** v.37, p.937-942, 1999.

JACOBSON, J.; DUCHEN, M. R. Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes – requirement for stored Ca2+ and sustained opening of the permeability transition pore. **J. Cell Sci**., v.115, p.1175-1188, 2002.

KAHN, S.E. The relative contributions of insulin resistance and *β*-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia,** v.46. p.3–19, 2003.

KANETO, H. et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic *β*-cell dysfunction and insulin resistance. **Int J Biochem Cell Biol,** v.38, p.782–793, 2006.

KANG, K.A. et al. Protective effect of *Puerariae* Radix on Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide and Streptozotocin. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n.7, p.1154-1160, 2005.

KATOCH, B; BEGUM, R. Biochemical basis of the high resistance to oxidative stress in *Dictyostelium discoideum*. **J. Biosci**, v.28, p.581, 2003.

KIM, B.H. et al. Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor - κB-dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. **Biochem Pharmacol**, v.69, p.1577-1583, 2005.

KIM, E.K. et al. Flavonoids Protect Against Cytokine-Induced Pancreatic β-Cell Damage Through Suppression of Nuclear Factor κB Activation. **Pancreas**, v.35, n.4, 2007a.

KIM, E.K. et al. *Coptidis rhizoma* extract protects against cytokine-induced death of pancreatic β-cells trhough suppression of NF-κB activation. **Exp. Mol. Med,** v.38, n.2, p.149-159, 2007b.

KIM, H.P. et al. Effects of naturally-occurring flavonoids and bioflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.58, p.17–24, 1998.

KIM, H.Y.; OKAMOTO, T.; YOKOZAWA, T. Beneficial effects of Chinese prescription Kangen-karyu on diabetes associated with hyperlipidemia, advanced glycation endproducts, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.263–269, 2009.

KIM, M.J. et al. Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: *in vivo* and *in vitro*. **Pancreas**, v.26, n.3, p.292–9, 2003.

KIMOTO, K. et al. Gliclazide protects pancreatic b-cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.112–119, 2003.

KIYOKO, K. et al. Gliclazide protects pancreatic β-cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v.303, p.112–119, 2003.

KNEKT, P. et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am J Clin Nutr**, v.76, p.560–8, 2002.

KWON, K.B. et al. *Cortex cinnamomi* extract prevents streptozotocin- and cytokine induced β-cell damage by inhibiting NF-κB. **World J Gastroenterol**, v.12, n.27, p.4331-4337, 2006.

LAPIDOT, T.; WALKER, M.D.; KANNER, J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic β-Cells in Vitro. **J. Agric. Food Chem**, v.50, p.7220-7225, 2002.

LAPOLLA, A.; TRALDI, P.; FEDELE, D. Importance of measuring products of nonenzymatic glycation of proteins. **Clinical Science,** v.38, p.103–115, 2005.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n.4, p.969-78, 1988.

LAYBUTT, D.R. et al.Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. **Diabetologia,** v.50, p.752-763, 2007.

LAYBUTT, D.R. et al. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to β-cell survival during chronic hyperglycemia. **Diabetes**, v.51, p.413–423, 2002.

LEAL-CARDOSO, J.H; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil, **An Acad Bras Cienc** v.7, p.207-213, 1999.

LEATHERDALE, B.A. et al. Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (Karela). **BMJ**, v.282, p.1823–1824, 1981.

LEE, S-M.; YOON, M-Y.; PARK, H-R. Protective Effects of *Paeonia lactiflora* Pall on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in PC12 Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.72, n.5, p.1272-1277, 2008.

LEE, W.K.; LEE, H.J. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. **Biofactors**, v.26, p.105–121, 2006.

LEITE,H.P.; SARNI, R.S. Resumo Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin**, v.18, n.2, p.87-94, 2003.

LENNON, S.V.; MARTIN, S.J.; COTTER, T.G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Prolif**, v.24, n.2, p.203-14, 1991.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low Antioxidant Enzyme Gene Expression in Pancreatic Islets Compared With Various Other Mouse Tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 463-466, 1996.

LIU, D. et al. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic beta-cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. **Diabetes,** v.55, n.4, p.1043-50, 2006.

LIU, I-M. et al. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. **Life Sciences**, v.81, p.1479–1488, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum**, São Paulo, p. 13-28. 2002.

MADARA, J.L.; BARENBERG, D.; CARLSON, S. Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: Further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. **J Cell Biol**, v.102, n.6, p.2125–2136, 1986.

MAIA, J.G.S. et al. A new chemotype of Eugenia uniflora L. from north Brazil. **J. Essent. Oil Res**., v.11, p.727-729, 1999.

MANDRUP POULSEN, T.The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. **Diabetologia**, v.39, p.1005–1029, 1996.

MARTINEZ-FLOREZ, S. et al. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp**., v.XVII, n.6, p.271-278, 2002.

MARTINEZ-FLOREZ, S. et al. Quercetin attenuates nuclear factor-κB activation and nitric oxide production in interleukin- 1β-activated rat hepatocytes. **J. Nutr**, v.135, p.1359-1365, 2005.

MARX, J.L. Oxygen free radicals linked to many disease conditions; **Science**, v.235, p.529–531, 1985.

MATSUMURA, T. et al. α- Glucosidase inhibitors from paraguayan naturaL medicine, Ñangapiry the leaves of *Eugenia uniflora*. **Pharm. Biol**, v.38, p.302-307, 2000.

MCBRIDE, R.K.; STONE, K.K.; MARIN, M.G. Oxidant injury alters barrier function of ferret tracheal epithelium. **Am J Physiol**, v.264, p.L165–L174, 1993.

MEIER, J. et al. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? **Diabetologia**, v.48, n.11, p.2221–8, 2005.

METODIEWA, D. et al. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant product. **Free Radical Biol. Med.**, v.26, p.107-116, 1999.

MEZA I. et al. Occluding junctions in MDCK cells: Modulation of transepithelial permeability by the cytoskeleton. **J Cell Biochem**, v.18, n.4, p.407–421, 1982.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, S. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implictions for immunity, inflammation and cancer. P. 619-652. In **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. Editor: J.B. Harborne. Chapman and Hall, London, 1993.

MILTERSTEINER A. et al. Uso de quercetina a longo prazo em ratos cirróticos. **Acta Cirúrgica Brasileira,** v.18, p.232-237, 2003.

MOHAMED, A. K. et al. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications**. Biofactors,** v. 10, p. 157-167, 1999.

MOMOSE, Y. Pentahydoryndolizidine and α-glucosidase inhibitors containing products of *Eugenia uniflora*. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**,v.72, p.770, 2000.

MORAIS, S.M. et al. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. **J. Essent. Oil Res**, v.8, p.449- 451, 1996.

MORGAN, C. R.; LAZAROW, A. Immunoassay of insulin: two antibodies system: plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats. **Diabetes**, v. 12, p. 115-121, 1963.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth andsurvival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology,** v. 65, p.55–63. 1983.

MOYER, R.A et al. Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. **J. Agric. Food Chem**., v.50, p.519-525, 2002.

MUNIZ, B.L. **Caracterização química, física e de compostos funcionaisem cebolas frescas e minimamente processadas**. 2007, 160f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana). Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2007.

MUROTA, K.; TERAO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch Biochem Biophys**, v.417, n.1, p.12-7, 2003.

NADKARNI, A.K. **Indian Materia Medica**, v.1. Bombay: Popular Prakashan, p. 157, 1992.

NAKAMURA, C.V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L essential oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.94, p.675-678, 1999.

NAKATANI, Y. et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. **J. Biol. Chem**., v.280, p.847-851, 2005.

NATARAJAN, R. et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. **Hypertension**, v. 33, p. 378-384, 1999.

NEWSHOLME, P. et al**.** Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **J Physio,** v.583, n.1, p. 9–24, 2007.

NIJVELDT, R.J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v.74, p.418–25, 2001.

NISHIKAWA, T. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature,** v. 13, p. 787-790, 2000.

NOROOZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage inhuman lymphocytes. **American Journal of Clinical Nutrition,** v.67, n.6, p.1210-1218, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J. et al. Relationships Between Plasma Measures of Oxidative Stress and Metabolic Control in NIDDM, **Diabetologia,** v.4*0*, p.647–653, 1997.

OHNO, T. et al. Genistein augments cyclic adenosine 35-monophosphate(cAMP) accumulation and insulin release in MIN6 cells. **Endocr Res**., v.19, p.273–285, 1993.

OKADA, Y.; KANEKO, M.; OKAJIMA, H. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furanfatty acids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.12, p.1607-10, 1996.

OLIVEIRA, C.S.L.D.; LUNARDI FILHO, W.D. AIDS e Diabetes Mellitus Versus Justiça Distributiva no Sistema Público de Saúde. **Revista Brasileira de Enfermagem,** v.57, p.750-753, 2004.

OLIVEIRA, H.R. et al. Pancreatic *β*-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. **Diabetes**, v. 52, p.1457–1463, 2003.

OLIVEIRA, M.C. et al. Efeito da sacaca- *Croton cajucara*, Benth sobre os níveis plasmaticos de lipídios em coelhos hipercolesterolêmicos. In: X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1995, Serra Negra. X Reunião da FESBE, 1995.

ONG, K.C.; KHOO, H-E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v.67, p.1695-1705, 2000.

OZCAN, U. et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action and Type 2 diabetes. **Science,** v.306, p.457-461, 2004.

PEPATO, M.T. et al. Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**. V.96, p.43–48, 2005.

PEREZ, M.; BARBER, A.; PONZ, F. Modulation of intestinal paracellular permeability by intracellular mediators and cytoskeleton. **Can J Physiol Pharmacol**, v.75, n.4, p.287–292, 1997.

PERSAUD, S.J. et al. Tyrosine kinases play a permissive role in glucose-induced insulin secretion from adult rat islets. **J Mol Endocrinol**., v.22, n.1,p.19-28, 1999.

PHYTOCHEMICALS. Disponível em: <http://www.phytochemicals.info/>. Acesso em: 02 Out. 2009.

PINENT, M. et al. Bioactivity of Flavonoids on Insulin-Secreting Cells. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 7, p.299-308, 2008.

PLANTAS MECININALES. Disponível em: < www.plantamedicinales.org>. Acesso em: 08 abr. 2009.

POOL-ZOBEL, B.L. et al. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid--rich foods. **Carcinogenesis**, v.18, n.9, p.1847-1850, 1997.

PUPO, A. A.; MARREIRO, D. Dosage of insulin levels using radioimmunoassay with double antibodies. **AMB Rev Assoc Med Bras,** v. 16, p. 153-156, 1970.

RABINOVITCH, A. et al. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v.81, p.3197–3202, 1996.

RACHEK, L.I. et al. Protection of INS-1 cells from free fatty acid-induced apoptosis by targeting hogg1 to mitochondria. **Diabetes**, v.55, p.1022–1028, 2006.

RAMAN, A.; LAU, C. Antidiabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). **Phytomedicine**, v.2, p.349–362, 1996.

RATTY, A.K. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure activity relationship. **Biochem Med Metabol Biol**, v.39, p.67-79, 1988.

REYNERTSON, K.A.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications,** v.3, p.025-035, 2005.

ROBAK, J, GRYGLEWSKI, R.J. Bioactivity of flavonoids. **Pol J Pharmacol** v.48, p.555–64, 1996.

ROBB, S. J. et al. Influence of calcium and iron on cell death and mitochondrial function in oxidatively stressed astrocytes. **J. Neurosci. Res**., v.55, p,674-686, 1999.

ROBERTSON, R. P. et al. Glucose Toxicity in β-Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. **Diabetes**, v. 52, 2003.

RÜCKER, G. et al. Neue inhaltsstoffe aus Stenocalyx Michelii. **Planta Med**., v.31, p.305-340, 1977.

RUFINO, MS.M et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β-caroteno/Ácido Linoléico. **Comunicado Científico**, Embrapa, n. 126, 2006.

RUIZ, P.A.; HALLER, D. Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-κB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. **J. Nutr**, v.136, p. 664-671, 2006.

SAH, N.K. et al. The baculovirus anti-apoptotic p35 gene also functions via an oxidant dependent pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA, v.96, p.4838–4843, 1999.

SANTANGELO, C. et al. Hepatocyte growth factor protects rat RINm5F cell line against free fatty acid-induced apoptosis by counteracting oxidative stress. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.38, p.147–158, 2007.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. F. Tendências do diabetes mellitus no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública,** v. 19, supl. 1, p. 1 – 15, 2003.

SATO, S. Amazônia já perdeu 14% de sua vegetação. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 12 de abril de 2000.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **The Journal of Nutrition**, p.2072S-2085S, 2000.

SHAN LAI, E.W. **Diabetes and endoplasmic reticulum stress in pancreatic β-cells: effects on insulin biosynthesis and β-cell apoptosis**. 2008. 154f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Toronto, Toronto, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Ethnobotanical observations on Paraguayan Myrtaceae. I. **J. Ethnopharmacol**, v.22, p.73–79, 1988.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. **J. Ethnopharmacol**, v.21, p.183-186, 1987.

SESTILI, P. et al. Quercetin prevents dna single strand breakage and cytotoxicity caused by *tert*-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 2, p. 196–200, 1998.

SHARMA, S.B. et al. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.367–373, 2006.

SHETTY, A.K. et al. Antidiabetic influence of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v.24, n.5, p.373–381, 2004.

SHOSKES, D.A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. **Transplantation**, v.66, p.147–52, 1998.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition,** v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 2002, p.443-459, 2002.

SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Anti-inflammatory compounds of *Eugenia jambos*. **Phytotherapy Research,** v.10, p.S126-S127, 1996.

SOARES, S.E. Phenolic acids as antioxidants**. Revista de Nutrição,** v.15,p. 71-81, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Disponível em: < http: //www.diabetes.org.br>. Acesso em: 20 Maio 2009.

SONG, Y. et al. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: A prospective study and cross-sectional analysis. **Journal of the American College of Nutrition,** v.24, p.376-384, 2005.

SOTO, C. et al. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. **Life Sci.,** v.75, n.18, p.2167–80, 2004.

STANLEY, M.P.P.; KAMALAKKANNAN, N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. **J Biochem Mol Toxicol**, v.20, p.96–102, 2006.

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chemical Toxicology**, v.32, n.1, p.79-90, 1994.

STEVENSON, B.R.; BEGG, D.A. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. **J Cell Sci**, v.107, p.367–375, 1994.

TAKABAYASHI, F. et al. Effect of green tea catechins on the amount of 8-hydroxydeo xyguanosine (8-OHdG) in pancreatic and hepatic DNA after a single administration of N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP). **Pancreas**, v.15, n.2, p.109– 12, 1997.

TANG, J.P.; ZHANG, J.H. Mechanisms of [Ca2+]i elevation by H2O2 in islets of rats. **Life Sci**, v.68, p.475–481, 2000.

TANIKAWA, K., TORIMURA, T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. **Medical Molecular Morphology**, v.39, p.22–27, 2006.

TIEDGE, M. et al. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. **Diabetes**, v.46, p.1733–1742, 1997.

TOURREL, C. et al. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. **Diabetes**, v.51, n.5, p.1443–52, 2002.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol,** v.552, p.335–344, 2003.

TYLER, V.E. Phytomedicines: back to the future. **J. Nat. Prod**, v.62, p.1589-1592, 1999.

VALEN, G. et al. Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization. **Free Radical Biology & Medicine**, v.11-12, n.26, p.1480-1888, 1999.

VAN DEN BERG, M. E.; **Plantas Medicinais na Amazônia- Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. Belém: Ed. Falangola,1982, p. 158.

VELÁZQUEZ E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, p.91–97, 2003.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Hypoglycemic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v.135C, p.357–364, 2003.

VIZZOTTO, M**.** Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate a doenças**.** In: III Simpósio Nacional do Morango II Encontro sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul, 2006, Pelotas. **Palestra**, Pelotas: editores Luis Eduardo Corrêa Antunes, Maria do Carmo Bassols Raseira. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006, p. 145.

VOLPATO, G.T. et al. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.131–137, 2008.

WANG, H.; KOURI, G; WOLLHEIM, C.B. ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity. **J Cell Sci**., v.118, p.3905-15, 2005.

WARIER, P.K. *Momordica charantia* Linn. **Indian Medicinal Plants**. Orient Longman, Chennai, p.48–51, 1995.

WATERS, C.M.; SAVLA, U.; PANOS, R.J. KGF prevents hydrogen peroxide-induced increases in airway epithelial cell permeability. **Am J Physiol**, v.272, p.L681–L689, 1997.

WEI, Z. et al. Olanzapine Protects PC12 Cells From Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide. **Journal of Neuroscience Research**, v.73, p.364–368, 2003.

WEIJL, N.I., CLETON, F.J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v.23, n.4, p.209- 240, 1997.

WEST, I.C. Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabetic Medicine**, v.17, p.171–180, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/ factsheets/fs312/en/index.html>. Acesso em: 12 Maio 2009.

WYERSTAHL, P. et al. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* L. leaf oil. **Planta Med.**, v.6, p.546-549, 1988.

YAGMUR, E. et al. Elevation of *N*-(carboxymethyl) lysine-modified advanced glycation end products in chronic liver disease is an indicator of liver cirrhosis. **Clinical Biochemistry,** v.39, p.39–45, 2006.

YAMAYA, M. et al. Oxidants affect permeability and repair of the cultured human tracheal epithelium. **Am J Physiol**, v.268, p.L284–L293, 1995.

YOON, S. H. et al. Anti-Apoptotic Effect of *Rheum undulatum* Water Extract in Pancreatic β-cell Line, HIT-T15. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 8, p.51-55, 2004.

YOSHIKAWA, M. et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and a-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** v.46, p.113-119, 1998.

ZHAO, Y.; DAVIS, H. W. Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. **J. Cell. Physiol**., v.174, p.370-379, 1998.

ZHU, D. et al. Hydrogen Peroxide Alters Membrane and Cytoskeleton Properties And Increases Intercellular Connections In Astrocytes. **Journal of Cell Science**, v.118, n.16, p.3695-3703, 2005.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo