



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA DE PLANTAS DO CEARÁ: POTENCIAL  
FARMACOLÓGICO DE *Cissus verticillata* E COMPOSIÇÃO VOLÁTIL  
DE *Myrcia sp.***

**Francisco Serra Oliveira Alexandre**

Fortaleza – CE

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA DE PLANTAS DO CEARÁ: POTENCIAL  
FARMACOLÓGICO DE *Cissus verticillata* E COMPOSIÇÃO VOLÁTIL  
DE *Myrcia sp.***

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Química Orgânica, como requisito parcial para a obtenção do  
Título de Mestre

ALUNO: Francisco Serra Oliveira Alexandre

ORIENTADOR: Prof. Edilberto Rocha Silveira / Ph.D.

A369a Alexandre, Francisco Serra Oliveira  
Análise fitoquímica de plantas no Ceará : potencial farmacológico de *Cissus verticillata* e composição volátil de *Myrcia sp.* / Francisco Serra Oliveira Alexandre. – 2007.  
140 f. : il. : color., enc.

Orientador: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira  
Área de concentração: Química Orgânica de Produtos Naturais  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2007.


1. Plantas – Análise 2. Química vegetal 3. Vitaceae 4. Cissus I. Silveira, Edilberto Rocha (Orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Química Orgânica III. Título


CDD 547

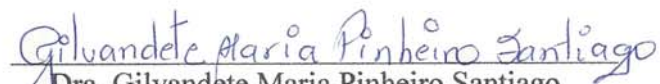
Esta Dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e em cuja Biblioteca Central encontra-se à disposição dos interessados.

  
Francisco Serra Oliveira Alexandre

Dissertação aprovada em: 18/01/2007

  
Dr. Edilberto Rocha Silveira  
(Orientador-UFC)

  
Dra. Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque  
(UVA)

  
Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago  
(UFC)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pois na minha trajetória Ele sempre esteve presente direcionando meus passos e me dando a certeza de que permanecerá comigo até o momento de nosso encontro definitivo.

Agradeço aos meus pais, João Alexandre Gomes (*in memoriam*) e Luci Serra Oliveira Alexandre, pelo exemplo de vida, de fé, de amor e de luta.

À minha esposa Maria Eliane de Oliveira Alexandre e minhas filhas Débora Maria de Oliveira Alexandre e Maria Clara de Oliveira Alexandre por me ensinarem a beleza da família e por vivermos juntos os momentos mais felizes de minha vida.

Ao meu orientador professor Edilberto Rocha Silveira, pelos ensinamentos transmitidos a cada dia, por acreditar no meu potencial e por me mostrar o caminho da dedicação, aprimoramento, aperfeiçoamento e o amor pelo que faz. Obrigado pelos conselhos pessoais, pois muito mais difícil que formar mestres é formar pessoas humanas.

Às professoras Mary Anne Souza Lima e Maria da Conceição Ferreira de Oliveira, por seus exemplos e dedicação na coordenação da pós-graduação em Química Orgânica.

Às professoras Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque e Gilvandete Maria Pinheiro Santiago pelas observações relevantes feitas na defesa desta dissertação.

À professora Dra. Glauce S. B. Viana e a sua orientanda de doutorado, Cleide de S. Lino pela realização dos estudos farmacológicos das frações de *Cissus verticillata*.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, especialmente por aqueles que foram responsáveis diretamente pela minha formação profissional abrindo as portas do conhecimento através das diversas disciplinas ministradas.

Aos operadores dos aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear: Cláudio, Daniel, Henrique, Renata e Kirley, pela obtenção dos espectros.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrandos e doutorandos, em especial àqueles que me ajudaram nas atividades do cotidiano no laboratório, meus amigos Alexandre, Artur, Bartolhomeu, Érika, Gizelle, Jefferson, João Carlos, Sávio e Sammy.

Aos funcionários do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, especialmente a Célia, Lana, Mundinha e Sr. Paulo.

À Universidade Federal do Ceará, por proporcionar-me esta oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

## SUMÁRIO

|   |              |
|---|--------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>   | <b>VIII</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b>   | <b>XII</b>   |
| <b>LISTA DE FLUXOGRAMAS</b>   | <b>XIII</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>  | <b>XIV</b>   |
| <b>RESUMO</b>   | <b>XVI</b>   |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>XVIII</b> |
| <br>  |              |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>  | <b>01</b>    |
| <br>  |              |
| <b>2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS</b>   | <b>08</b>    |
| 2.1 Considerações botânicas sobre a família Vitaceae  | <b>08</b>    |
| 2.2 Considerações botânicas sobre o gênero <i>Cissus</i>  | <b>10</b>    |
| 2.3 Considerações botânicas sobre <i>Cissus verticillata</i>  | <b>10</b>    |
| 2.4 Considerações botânicas sobre a família Myrtaceae   | <b>14</b>    |
| <br>  |              |
| <b>3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO</b>  | <b>19</b>    |
| 3.1 Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Cissus</i>  | <b>19</b>    |
| <br>  |              |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | <b>36</b>    |
| 4.1 Estudo dos constituintes voláteis de <i>Myrcia sp.</i>  | <b>36</b>    |
| 4.2 Isolamento e identificação de metabólicos secundários da fração metanólica do decocto de <i>Cissus verticillata</i>         | <b>49</b>    |
| 4.3 Isolamento e identificação de metabólicos secundários da fração hexânica do extrato etanólico de <i>Cissus verticillata</i> | <b>63</b>    |
| 4.3.1 Isolamento e identificação de EH-1  | <b>63</b>    |
| 4.3.2 Isolamento e identificação de EH-2  | <b>69</b>    |
| <br>  |              |
| <b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b>  | <b>76</b>    |
| 5.1 Material vegetal  | <b>76</b>    |
| 5.1.1 Material vegetal de <i>Cissus verticillata</i>  | <b>76</b>    |
| 5.1.2 Material vegetal de <i>Myrcia sp.</i>   | <b>76</b>    |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2 Procedimento experimental para a extração dos óleos essenciais de <i>Myrcia</i><br><i>sp.</i>  | 76        |
| 5.3 Métodos cromatográficos  | 79        |
| 5.4 Métodos espectrométricos   | 79        |
| 5.4.1 Espectrometria na região do infravermelho (IV)   | 79        |
| 5.4.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN<br><sup>1</sup> H) e de carbono-13 (RMN <sup>13</sup> C).   | 80        |
| 5.4.3 Espectrometria de massa (EM)   | 81        |
| 5.5 Ponto de fusão   | 81        |
| 5.6 Decoctos de folhas frescas de <i>Cissus verticillata</i>   | 81        |
| 5.6.1. Fracionamento cromatográfico de CVFDSM  | 82        |
| 5.6.1.1 Isolamento cromatográfico de SM-1  | 84        |
| 5.6.2. Obtenção de frações ricas em tiramina provenientes de <i>Cissus</i><br><i>verticillata</i> para o estudo de sua ação hipoglicemiante  | 85        |
| 5.6.2.1. Obtenção de fração rica em tiramina proveniente do segundo<br>fracionamento cromatográfico de CVFDSM  | 85        |
| 5.6.2.2. Obtenção de fração rica em tiramina proveniente do terceiro<br>fracionamento cromatográfico de CVFDSM   | 86        |
| 5.7 Extrato etanólico de <i>Cissus verticillata</i>  | 87        |
| 5.7.1 Partição líquido-líquido de CVFEET   | 87        |
| 5.8. Preparação do decocto a partir da torta proveniente da extração com<br>etanol das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>  | 90        |
| 5.9. Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH   | 92        |
| 5.9.1 Isolamento de EH-1   | 93        |
| 5.9.2 Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> e isolamento de<br>EH-2   | 94        |
| 5.9.3 Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> e isolamento de<br>EH-3   | 95        |
| <b>6. ESTUDO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE <i>Cissus</i><br/><i>verticillata</i></b>   | <b>98</b> |
| 6.1. Estudo da ação hipoglicemiante da fração de <i>Cissus verticillata</i> solúvel<br>em metanol (CVFDSM) (SF*) e da fração rica em tiramina (CVFDSM-F <sub>19-24</sub> )<br>(TRF*) em ratos diabéticos | 98        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>7. CONCLUSÃO</b>  | <b>110</b> |
| <b>8. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS</b>                          | <b>113</b> |
| 8.1. SM-1 : 4-(2-aminoetil)fenol   | 113        |
| 8.2. EH-1: glicosídeo do $\beta$ -sitosterol                                   | 114        |
| 8.3. EH-2: $\beta$ -sitosterol   | 115        |
| <b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>   | <b>117</b> |
| <b>10. ANEXOS</b>  | <b>124</b> |
| Artigo: American Journal of Pharmacology and Toxicology 2 (4):178-188,<br>2007 |            |
| Artigo: The Open Pharmacology Journal, 2008, 2, 63-69                          |            |



## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>FIGURA 01</b> | Família Vitaceae, ilustrações de alguns de seus gêneros. Adaptada de Joly, 1998.   | <b>09</b> |
| <b>FIGURA 02</b> | Detalhe dos ramos com flores de <i>Cissus verticillata</i> . Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).                            | <b>11</b> |
| <b>FIGURA 03</b> | Detalhe dos ramos com frutos jovens de <i>Cissus verticillata</i> . Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).                     | <b>11</b> |
| <b>FIGURA 04</b> | Detalhe dos frutos jovens de <i>Cissus verticillata</i> . Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).                               | <b>11</b> |
| <b>FIGURA 05</b> | Detalhe dos frutos maduros de <i>Cissus verticillata</i> . Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).                              | <b>12</b> |
| <b>FIGURA 06</b> | Ramos e frutos de <i>Cissus verticillata</i> . Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).  | <b>12</b> |
| <b>FIGURA 07</b> | <i>Cissus verticillata</i> mostrando a sua fácil distribuição nas regiões tropicais. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).    | <b>13</b> |
| <b>FIGURA 08</b> | <i>Cissus verticillata</i> com aspecto que justifica o nome popular “cortina-de-pobre”. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC). | <b>13</b> |
| <b>FIGURA 09</b> | Família Myrtaceae , ilustrações de alguns de seus gêneros. Adaptada de Joly, 1998.   | <b>15</b> |
| <b>FIGURA 10</b> | Aspecto geral de <i>Myrcia sp.</i> Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).  | <b>16</b> |
| <b>FIGURA 11</b> | Detalhe dos ramos e frutos de <i>Myrcia sp</i> Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).  | <b>16</b> |
| <b>FIGURA 12</b> | Detalhe dos frutos verdes e maduros de <i>Myrcia sp.</i> Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).                                | <b>17</b> |
| <b>FIGURA 13</b> | Detalhe das inflorescências de <i>Myrcia sp.</i> Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).  | <b>17</b> |
| <b>FIGURA 14</b> | Cortes transversais da folha de Myrtaceae.   | <b>36</b> |
| <b>FIGURA 15</b> | Cromatograma (CGL-EM) dos constituintes voláteis das folhas (GAOFOLHAS) de <i>Myrcia sp.</i>   | <b>40</b> |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>FIGURA 16</b> | Cromatograma (CGL-EM) dos constituintes voláteis dos frutos (GAOFRUTOS) de <i>Myrcia sp.</i>  | <b>40</b> |
| <b>FIGURA 17</b> | Cromatograma (CGL-FID) dos constituintes voláteis das folhas (GAOFOLHAS) de <i>Myrcia sp.</i>                                       | <b>41</b> |
| <b>FIGURA 18</b> | Cromatograma (CGL-FID) dos constituintes voláteis dos frutos (GAOFRUTOS) de <i>Myrcia sp.</i>                                       | <b>41</b> |
| <b>FIGURA 19</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) dos constituintes voláteis das folhas (GAOFOLHAS) de <i>Myrcia sp.</i> | <b>42</b> |
| <b>FIGURA 20</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz) dos constituintes voláteis dos frutos (GAOFRUTOS) de <i>Myrcia sp.</i> | <b>42</b> |
| <b>FIGURA 21</b> | Espectro de massa do δ-elemeno.   | <b>43</b> |
| <b>FIGURA 22</b> | Espectro de massa do β-elemeno.   | <b>43</b> |
| <b>FIGURA 23</b> | Espectro de massa do <i>trans</i> -cariofileno.   | <b>43</b> |
| <b>FIGURA 24</b> | Espectro de massa do α-guaieno.   | <b>44</b> |
| <b>FIGURA 25</b> | Espectro de massa do α-humuleno.  | <b>44</b> |
| <b>FIGURA 26</b> | Espectro de massa do β-chamigreno.  | <b>44</b> |
| <b>FIGURA 27</b> | Espectro de massa do germacreno D.  | <b>45</b> |
| <b>FIGURA 28</b> | Espectro de massa do β-selineno.  | <b>45</b> |
| <b>FIGURA 29</b> | Espectro de massa do β-guaieno.   | <b>45</b> |
| <b>FIGURA 30</b> | Espectro de massa do α-selineno.  | <b>46</b> |
| <b>FIGURA 31</b> | Espectro de massa do α-Z-bisaboleno.  | <b>46</b> |
| <b>FIGURA 32</b> | Espectro de massa do germacreno A.  | <b>46</b> |
| <b>FIGURA 33</b> | Espectro de massa do δ-cadineno.  | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 34</b> | Espectro de massa do germacreno B.  | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 35</b> | Espectro de massa do <i>epi</i> -α-muurolol.  | <b>47</b> |
| <b>FIGURA 36</b> | Espectro de massa do α-cadinol.   | <b>48</b> |
| <b>FIGURA 37</b> | Grupo 2-aminoetila.   | <b>50</b> |
| <b>FIGURA 38</b> | Correlações heteronucleares a mais de uma ligação observadas no espectro de RMN HMBC de SM-1.                                       | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 39</b> | Estrutura do 4-(2-aminoetil)fenol. Nome usual: Tiramina.  | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 40</b> | Espectro de IV de SM-1 (KBr, cm <sup>-1</sup> ).  | <b>53</b> |
| <b>FIGURA 41</b> | Espectro de massa de SM-1 (impacto eletrônico a 70 eV).   | <b>54</b> |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>FIGURA 42</b> | Espectro de massa do Cloridrato de tiramina (impacto eletrônico a 70 eV).   | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 43</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) de SM-1.   | <b>55</b> |
| <b>FIGURA 44</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO- <i>d</i> 6, 500 MHz) de SM-1.   | <b>55</b> |
| <b>FIGURA 45</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de SM-1.  | <b>56</b> |
| <b>FIGURA 46</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C (DMSO- <i>d</i> 6, 125 MHz) de SM-1..   | <b>56</b> |
| <b>FIGURA 47</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135 (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de SM-1.   | <b>57</b> |
| <b>FIGURA 48</b> | Espectro de RMN HMQC (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de SM-1.   | <b>58</b> |
| <b>FIGURA 49</b> | Espectro de RMN HMBC (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz) de SM-1.   | <b>59</b> |
| <b>FIGURA 50</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura: SM-1 e Cloridrato de tiramina (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).   | <b>60</b> |
| <b>FIGURA 51</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C da mistura: SM-1 e Cloridrato de tiramina (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).  | <b>60</b> |
| <b>FIGURA 52</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da fração (CVFDSM-F <sub>19-24</sub> ).  | <b>61</b> |
| <b>FIGURA 53</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da fração (E <sub>2</sub> CVFDSM-F <sub>13-20</sub> ) obtida no segundo fracionamento cromatográfico de CVFDSM.  | <b>62</b> |
| <b>FIGURA 54</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) da fração (E <sub>3</sub> CVFDSM-F <sub>11-19</sub> ) obtida no terceiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM. | <b>62</b> |
| <b>FIGURA 55</b> | Estrutura do β-sitosterol glicosilado.  | <b>64</b> |
| <b>FIGURA 56</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C-BB (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz) de EH-1.   | <b>66</b> |
| <b>FIGURA 57</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135 (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz) de EH-1.   | <b>66</b> |
| <b>FIGURA 58</b> | Espectro de RMN <sup>13</sup> C-DEPT 135 (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz) de EH-1. Expansão da região δ 18,0 a 80,0.   | <b>67</b> |
| <b>FIGURA 59</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 300 MHz) de EH-1.  | <b>67</b> |
| <b>FIGURA 60</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 300 MHz) de EH-1. Expansão da região δ 0,5 a 3,0.  | <b>68</b> |
| <b>FIGURA 61</b> | Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 300 MHz) de EH-1. Expansão da região δ 3,0 a 6,0.  | <b>68</b> |

|                  |   |            |
|------------------|---|------------|
| <b>FIGURA 62</b> | Estrutura do $\beta$ -sitosterol.   | <b>70</b>  |
| <b>FIGURA 63</b> | Espectro de IV de EH-2 (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ).  | <b>72</b>  |
| <b>FIGURA 64</b> | Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de EH-2.   | <b>72</b>  |
| <b>FIGURA 65</b> | Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de EH-2.   | <b>73</b>  |
| <b>FIGURA 66</b> | Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de EH-2.  | <b>73</b>  |
| <b>FIGURA 67</b> | Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de EH-2. Expansão da região $\delta$ 0,5 a 2,5.                                     | <b>74</b>  |
| <b>FIGURA 68</b> | Gráfico de avaliação da glicemia em soro de ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100).                  | <b>99</b>  |
| <b>FIGURA 69</b> | Gráfico de avaliação dos níveis de colesterol total (TC) em ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100).  | <b>100</b> |
| <b>FIGURA 70</b> | Gráfico de avaliação do nível de HDL-C medido do soro de ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100).     | <b>101</b> |
| <b>FIGURA 71</b> | Gráfico de avaliação dos níveis de triglicerídeos no soro de ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100). | <b>102</b> |
| <b>FIGURA 72</b> | Gráfico de avaliação dos níveis de VLDL em ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100).                   | <b>103</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                  |   |            |
|------------------|---|------------|
| <b>TABELA 01</b> | Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Cissus</i>  | <b>21</b>  |
| <b>TABELA 02</b> | Percentuais dos componentes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas (GAOFOLHAS) e frutos (FAOFRUTOS) de <i>Myrcia sp.</i>  | <b>39</b>  |
| <b>TABELA 03</b> | Correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HMQC e HMBC) de SM-1.  | <b>52</b>  |
| <b>TABELA 04</b> | Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de SM-1 (125 MHz) com os descritos na literatura para o cloridrato de tiramina (15 MHz, DMSO- <i>d</i> 6)   | <b>53</b>  |
| <b>TABELA 05</b> | Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) com os descritos na literatura para $\beta$ -sitosterol glicosilado, RMN $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz).       | <b>65</b>  |
| <b>TABELA 06</b> | Comparação dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ de EH-2 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) com os descritos na literatura para $\beta$ -sitosterol.  | <b>71</b>  |
| <b>TABELA 07</b> | Fracionamento cromatográfico de CVFDSM.   | <b>83</b>  |
| <b>TABELA 08</b> | Fracionamento cromatográfico de CVFDSM-F <sub>19-24</sub> .   | <b>84</b>  |
| <b>TABELA 09</b> | Segundo fracionamento cromatográfico de CVFDSM.   | <b>86</b>  |
| <b>TABELA 10</b> | Terceiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM.  | <b>87</b>  |
| <b>TABELA 11</b> | Frações da partição líquido-líquido de CVFEET.  | <b>88</b>  |
| <b>TABELA 12</b> | Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH.  | <b>93</b>  |
| <b>TABELA 13</b> | Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> .  | <b>94</b>  |
| <b>TABELA 14</b> | Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> .  | <b>95</b>  |
| <b>TABELA 15</b> | Avaliação da glicemia e dos níveis de lipídeos no plasma de ratos aloxan-diabéticos antes e depois do tratamento com glibenclamida.   | <b>104</b> |
| <b>TABELA 16</b> | Avaliação da glicemia e dos níveis de lipídeos no plasma de ratos aloxan-diabéticos antes e depois do tratamento com a fração rica em tiramina (CVFDSM-F <sub>19-24</sub> ) e com tiramina 1 mg/kg e tiramina 2 mg/kg. (T1 e T2). | <b>105</b> |

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

|                      |   |           |
|----------------------|---|-----------|
| <b>FLUXOGRAMA 01</b> | Método de extração do óleo essencial das folhas e dos frutos de <i>Myrcia sp.</i>   | <b>78</b> |
| <b>FLUXOGRAMA 02</b> | Partição líquido-líquido de CVFEET.   | <b>89</b> |
| <b>FLUXOGRAMA 03</b> | Partição líquido-líquido de CVFEET e preparação do decocto a partir da torta resultante do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i> . | <b>91</b> |
| <b>FLUXOGRAMA 04</b> | Isolamento de EH-1, EH-2 e EH-3.  | <b>96</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| <b>BB</b>                        | Broad-band   |
| <b>CCD</b>                       | Cromatografia em camada delgada  |
| <b>CGL/EM</b>                    | Cromatografia gás-líquido acoplada a espectrometria de massa   |
| <b>CGL-FID</b>                   | Cromatografia gás-líquido acoplada ao detector FID   |
| <b>COSY</b>                      | Correlation spectroscopy   |
| <b>CVFDIM</b>                    | Fração insolúvel em metanol do decocto das folhas frescas de <i>Cissus verticillata</i>  |
| <b>CVFDSM</b>                    | Fração solúvel em metanol do decocto das folhas frescas de <i>Cissus verticillata</i>  |
| <b>CVFEET</b>                    | Extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>   |
| <b>CVFEET-FA</b>                 | Fração em acetato do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>  |
| <b>CVFEET-FDCI</b>               | Fração em dicloro-metano do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>   |
| <b>CVFEET-FH</b>                 | Fração hexânica do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>  |
| <b>CVFEET-FH<sub>2</sub>O</b>    | Fase aquosa da partição do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>  |
| <b>CVFEET-FH<sub>2</sub>O-IM</b> | Fração insolúvel em metanol proveniente da fase aquosa da partição do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i> |
| <b>CVFEET-FH<sub>2</sub>O-SM</b> | Fração solúvel em metanol proveniente da fase aquosa da partição do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>   |
| <b>CVFEET-FnB</b>                | Fração em n-butanol do extrato etanólico das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>  |
| <b>CVFSDIM</b>                   | Fração insolúvel em metanol proveniente do decocto das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>                                      |
| <b>CVFSDIM-IH<sub>2</sub>O</b>   | Fração insolúvel em metanol e insolúvel em água proveniente do decocto das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>                  |
| <b>CVFSDIM-SH<sub>2</sub>O</b>   | Fração insolúvel em metanol e solúvel em água proveniente do decocto das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i>                    |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>CVFSDSM</b>            | Fração solúvel em metanol proveniente do decocto das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i> |
| <b>DEPT</b>               | Distortionless enhancement by polarization transfer   |
| <b>GAOFOLHAS</b>          | Óleo essencial das folhas de <i>Myrcia sp.</i>  |
| <b>GAOFRUTOS</b>          | Óleo essencial dos frutos de <i>Myrcia sp.</i>  |
| <b>HDL</b>                | Lipoproteína de alta densidade  |
| <b>HMBC</b>               | Heteronuclear multiple bond connectivity  |
| <b>HMQC</b>               | Heteronuclear multiple quantum coherence  |
| <b>IV</b>                 | Infravermelho   |
| <b>p.f</b>                | Ponto de fusão  |
| <b>RMN <sup>13</sup>C</b> | Ressonância magnética nuclear de carbono-13   |
| <b>RMN <sup>1</sup>H</b>  | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1   |
| <b>UV</b>                 | Ultravioleta  |
| <b>VLDL</b>               | Lipoproteína de baixa densidade   |



## RESUMO

O presente trabalho relata o estudo químico dos constituintes voláteis das folhas e frutos de *Myrcia sp.*, coletados no município de Amontada-CE em março de 2005 e a obtenção de frações e substâncias provenientes do decocto das folhas frescas e do extrato etanólico das folhas secas de *Cissus verticillata*, bem como o estudo concomitante do seu potencial farmacológico como hipoglicemiante através de testes realizados com a fração solúvel em metanol, fração rica em tiramina e com a tiramina, obtidos de *C. verticillata*. Os óleos essenciais de *Myrcia sp.* foram analisados por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (CGL/EM) e, quantitativamente, através do uso de CGL acoplada a detector do tipo FID. A análise do óleo essencial das folhas de *Myrcia sp.* (GAOFOLHAS), permitiu a identificação de treze componentes:  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -elemeno, *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -chamigreno, germacreno D,  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -guaiano,  $\alpha$ -selineno,  $\alpha$ -Z-bisaboleno,  $\delta$ -cadineno, *epi*- $\alpha$ -murolol e  $\alpha$ -cadinol. O óleo essencial dos frutos de *Myrcia sp.* (GAOFRUTOS) permitiu a identificação de onze componentes:  $\delta$ -elemeno,  $\beta$ -elemeno, *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -guaiano,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D,  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -selineno, germacreno A,  $\delta$ -cadineno e germacreno B. O estudo fitoquímico do decocto de *C. verticillata* resultou na fração rica em tiramina (CVFDSM-F<sub>19-24</sub>) que após fracionamento cromatográfico permitiu o isolamento da substância tiramina, inédita no gênero *Cissus*. Os testes realizados com esta fração e com a tiramina, em ratos com diabetes aloxan-induzida, mostraram redução na glicemia, colesterol total, triglicérides e níveis de VLDL e aumento nos níveis de HDL. O fracionamento cromatográfico da fração hexânica, proveniente do extrato etanólico das folhas secas de *C. verticillata*, permitiu o isolamento dos esteróides,  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -sitosterol-glicosilado. A caracterização estrutural das substâncias isoladas de *C. verticillata* foi realizada através do uso de técnicas espectroscópicas, tais como, infravermelho e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, incluindo técnicas uni e bidimensionais (HMBC e HMQC), bem como a comparação com dados descritos na literatura.

## ABSTRACT

The present work reports on the volatile constituents from leaves and fruits of *Myrcia sp.* collected in Amontada County-Ceará State, in march/2006. It also reports on the phytochemical analysis of the decoction solution from fresh leaves, and the ethanol extract of dried leaves of *Cissus verticillata* in a concomitant study of its pharmacological potential as hipoglycemiant. GLC/MS and GLC/FID analysis of the essential oil from leaves (GAOFOLHAS) allowed the identification of 13 components:  $\delta$ -elemene,  $\beta$ -elemene, *trans*-caryophyllene,  $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -chamigrene, germacrene D,  $\beta$ -selinene,  $\alpha$ -guaiene,  $\alpha$ -selinene,  $\alpha$ -Z-bisabolene,  $\delta$ -cadinene, *epi*- $\alpha$ -murolol and  $\alpha$ -cadinol, while the essential oil from fruits (GAOFRUTOS) allowed the identification of 11 components:  $\delta$ -elemene,  $\beta$ -elemene, *trans*-cariophyllene,  $\alpha$ -guaiene,  $\alpha$ -humulene, germacrene D,  $\beta$ -selinene,  $\alpha$ -selinene, germacrene A,  $\delta$ -cadinene and germacrene B. The silica-gel chromatography analysis of the decoction solution of fresh leaves of *C. verticillata* allowed the separation of a fraction rich in tyramine, and from it, pure tyramine. Pharmacological tests on rats with aloxan-induced glycemia with both the tyramine rich fraction and pure tyramine allowed reduction on the glycemia levels, as well as for total cholesterol, triglycerids and VLDL, but HDL increasing. Silica-gel chromatography analyses of the ethanol extract from dried leaves of *C. verticillata* allowed the isolation of  $\beta$ -sitosterol and its glucoside derivative. Structure determination of all substances of *C. verticillata* was accomplished by means of spectroscopic techniques such as IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, including uni and bi-dimensional pulse sequences (HMBC and HMQC) ad comparison with data from the literature.

## 1. INTRODUÇÃO

A professora Glauce S. B. Viana do Departamento de Farmacologia da UFC, propôs ao professor Edilberto Rocha Silveira a realização de parceria no trabalho desenvolvido pela doutoranda Cleide de Sousa Lino no desenvolvimento de sua tese sobre o estudo da ação hipoglicemiante de *Cissus verticillata*. A parceria teria como objetivo realizar o estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Cissus verticillata* e assim obter frações que pudessem proporcionar a realização de testes mais minuciosos visando à verificação de sua ação hipoglicemiante e também proporcionar o estudo farmacológico de outras atividades de suas frações.

Após a realização do levantamento bibliográfico inicial, constatou-se que dentre as espécies do gênero *Cissus*, as que têm sido mais intensamente estudadas em seus aspectos fitoquímicos e relatadas na literatura são as espécies *Cissus sicyoides* (*Cissus verticillata*), *Cissus quadrangularis*, *Cissus pallida* e *Cissus rheifolia*.

A espécie *Cissus verticillata* possui uma sinonímia extensa, como será apresentado nas considerações botânicas (Cap. 1), sendo que a maioria dos artigos da literatura usa a denominação *Cissus sicyoides* para identificá-la, porém de acordo com Nicolson e Jarvis, (1984) a primeira denominação é a mais indicada e portanto, foi adotada neste trabalho.

O chá das partes aéreas de *Cissus sicyoides* tem sido utilizado na medicina popular como antiinflamatório, antiepilético, anti-hipertensivo, antitérmico, anti-reumático, antidiabético (Bragança, 1996, Beltrame *et al*, 2001, Abreu *et al* 2003, Quílez *et al*, 2004), diurético e agente antibacteriano (Ahmed *et al*, 2000), antialérgico e no tratamento das seqüelas do acidente vascular cerebral. No norte do Pará (Beltrame *et al*, 2001) e em Lavras, estado de Minas Gerais (Barbosa *et al*, 2002), o chá das partes aéreas é usado no tratamento de *diabetes mellitus* tipo 2.

Particularmente da espécie *Cissus sicyoides* foram isolados antocianinas provenientes dos frutos (Toledo *et al*, 1983), flavonóides, esteróides, (Beltrame *et al*, 2001), cumarinas glicosídicas (Beltrame *et al*, 2002), compostos fenólicos (Ahmed *et*

al, 2000) e estilbenos (Quílez *et al*, 2004). A distribuição destas substâncias ao longo da planta se dá em todas as partes, com destaque principal para as partes aéreas.

Segundo Barbosa *et al*, (2002), o sumo de *Cissus verticillata* é usado na medicina tradicional paraense, em associação com o de outras espécies para o tratamento de seqüelas do acidente vascular cerebral e o seu chá tem sido utilizado continuamente como antidiabético, validando o nome popular de “insulina vegetal”. Segundo o artigo esta atividade hipoglicemiante poderia estar relacionada com a existência de flavonóides no chá de *C. verticillata*.

De acordo com Barbosa *et al*, (2002): “com o intuito de validar esta informação com ensaios *in vivo*, foram realizados testes administrando-se extrato aquoso das folhas de *Cissus verticillata* a ratos normoglicêmicos. Foi detectada uma diferença de 30,3 mg/dL no teor de glicose no sangue dos animais do grupo teste, o que indica uma redução de 19,5% em relação ao valor de referência registrado para o grupo controle, após a administração do extrato aquoso de folhas de *C. verticillata*. Os valores médios encontrados foram de 155,4 mg/dL para o grupo controle e 125,1 mg/dL para o grupo teste. Observou-se ainda o consumo aumentado de líquido pelo grupo teste (60 mL de água contra 100 mL de extrato).”

Segundo Barbosa *et al*, (2002) a composição do extrato aquoso de *C. verticillata* foi estudada quanto à presença de flavonóides. Após a realização da análise cromatográfica da fração acetato de etila, obtida por partição líquido-líquido a partir do extrato aquoso hidrolisado e tratamento do cromatograma com FeCl<sub>3</sub>, foi possível identificar manchas características de compostos fenólicos. Através de cromatografia em coluna foram isolados três flavonóides: canferol, luteolina e luteolina-3'-sulfato.

Ainda segundo Barbosa *et al*, (2002): “O chá de *Cissus verticillata* apresentou ação hipoglicemiante em ratos considerados normoglicêmicos, e provavelmente desenvolve efeito semelhante em humanos, tal como afirma a medicina popular mineira. Este efeito, presumivelmente, se deve à presença de flavonóides, encontrados em grandes quantidades tanto no chá quanto no extrato etanólico. O extrato aquoso também apresenta canferol livre, possivelmente acompanhado de seu glicosídeo, o que justificaria, ao menos em

parte, a atividade hipoglicemiante do vegetal *in vivo*, já que se trata de um flavonol com ação diurética e hipoglicemiante.”

De acordo com Pepato *et al* (1998), O decocto das folhas de *Cissus sicyoides* é amplamente usado como um remédio popular para *diabetes mellitus* no Brasil onde seu nome comum é “insulina vegetal”. Porém, poucas tentativas foram realizadas no sentido de determinar cientificamente se *C. sicyoides* possui efeitos anti-diabéticos.

Pepato *et al* (1998), descreve o estudo farmacológico realizado e os resultados obtidos: “Assim o decocto das folhas de *C. sicyoides* foi administrado por um período prolongado em ratos normais e em ratos streptozotocin-diabéticos. Foram investigados os efeitos deste tratamento nos parâmetros fisiológicos e metabólicos que são alterados em animais diabéticos. O modelo experimental adotado foi concebido para ser apropriado à comparação com um tratamento paralelo com insulina, que conduziu a melhorias esperadas em vários valores dos parâmetros anormais.”

Segundo Pepato *et al* (1998), **“O tratamento com o decocto reduziu significativamente a ingestão de alimentos e líquidos e o volume de urina excretada, como também os níveis de glicose do sangue, glicose urinária e uréia na urina, em comparação com os grupos controles.** O metabolismo de lipídios não foi afetado pelo tratamento; nem o nível de glicogênio hepático em animais diabéticos, que indicaram que o mecanismo responsável pela melhoria do metabolismo de carboidratos, observado em animais tratados com o decocto, não pode envolver inibição da glicogenólise e(ou) estimulação da glicogênese.”

Beltrame, *et al* (2001), isolou canferol 3- $\alpha$ -raminosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo do extrato hidro-alcoólico de folhas de *Cissus sicyoides* e também realizou estudos farmacológicos desse extrato sobre a tolerância à glicose intravenosa em animais tratados com dexametasona. Os testes foram realizados empregando-se ratos machos da linhagem Wistar.

Segundo Beltrame, *et al* (2001), “no primeiro ensaio biológico foi investigado o efeito do tratamento com o extrato hidro-alcoólico das folhas de *C. sicyoides* sobre a

tolerância à glicose intravenosa em animais tratados com dexametasona. O tratamento com dexametasona (1g/kg) diminuiu a tolerância à glicose. Assim a associação dexametasona juntamente com o extrato das folhas de *C. sicyoides* teve como objetivo investigar a possibilidade de que esta possa promover melhoria na tolerância à glicose. Os resultados mostraram que há uma maior glicemia no grupo tratado com dexametasona quando comparado ao grupo controle. Este efeito foi intensificado quando a dexametasona foi associada ao extrato de *C. sicyoides*.”

Conclui Beltrame, *et al* (2001): “Assim, os dados obtidos [...] sugerem que o extrato de *Cissus sicyoides* **augmenta o grau de intolerância à glicose promovida pela dexametasona, sugerindo um efeito diabtogênico e não antidiabético** como acredita a população usuária desta planta. Como o tratamento com o extrato hidro-alcoólico promoveu discreta redução da glicemia no tempo zero (basal), em relação ao grupo controle (resultados não apresentados), associado ao fato de que alguns flavonóides apresentam propriedades antidiabéticas, o fracionamento foi direcionado para o isolamento destas substâncias, resultando na obtenção dos flavonóides, canferol 3- $\alpha$ -raminosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo. Os flavonóides citados foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliar uma possível atividade insulínogênica. Para isto, o efeito dos flavonóides canferol 3- $\alpha$ -raminosídeo e quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo na síntese do glicogênio foi investigado [...] diferentemente da insulina (controle positivo), os flavonóides não estimularam a síntese do glicogênio. Nossos resultados estão de acordo com a literatura científica, que aponta um grande número de compostos com potencial antidiabético, porém não confirmados em estudos laboratoriais.”

Esta dialética motivou o prosseguimento dos trabalhos e assim definiu-se como objetivo geral, realizar a análise fitoquímica de *Cissus verticillata*, contribuindo para o conhecimento químico-farmacológico da espécie, além do treinamento no estudo dos componentes voláteis de plantas da caatinga nordestina.

Os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

a) A busca do possível “princípio ativo” presente no chá das folhas de *Cissus verticillata* responsável pela atividade hipoglicêmica preconizada pelo uso na

medicina folclórica e identificada nos estudos preliminares realizados no Departamento de Farmacologia da UFC.

b) Realizar o fracionamento cromatográfico do decocto das folhas de *C. verticillata* e obter frações para a investigação do seu potencial farmacológico.

c) Determinação do teor (%) e identificação dos constituintes químicos da fração volátil, obtida por hidrodestilação das folhas e dos frutos de uma espécie de *Myrcia* coletada na caatinga cearense.

Assim encontra-se relatado neste trabalho, o estudo fitoquímico dos constituintes voláteis de *Myrcia sp.* (Myrtaceae) e dos constituintes não-voláteis de *Cissus verticillata* (Vitaceae).

A análise dos constituintes voláteis de *Myrcia sp.* foi motivada pelo forte odor expelido pelas suas folhas, frutos e inflorescências. Esta propriedade organoléptica foi confirmada através da literatura, que relata a existência de glândulas oleíferas nas folhas dos representantes da família Mirtaceae. (Joly, 1998)

*Cissus verticillata* conhecida popularmente como anil-trepador, cipó-pucá, cipó-puci, puçá, insulina, insulina vegetal, uva-brava, tinta-dos-gentios, cortina-de-pobre, é muito conhecida na medicina popular, pois o chá de suas partes aéreas é usado como antiinflamatório, antiepilético, anti-hipertensivo, antitérmico, antireumático e antidiabético, em especial no tratamento do *Diabetes mellitus* tipo 2. A decisão de trabalhar com o decocto de suas folhas foi motivada pelo uso popular na forma de chás e confirmada pela literatura que valida o uso do extrato aquoso das folhas de *Cissus verticillata* como redutor dos níveis de glicemia aloxan-induzida em ratos diabéticos. (Lorenzi & Matos, 2002; Silva, 1995; Barbosa 2002; Beltrane *et al*, 2001).

Esta dissertação contém em seu primeiro capítulo, as considerações botânicas sobre as famílias Vitaceae e Myrtaceae, sobre o gênero *Cissus* e sobre as espécies *Cissus verticillata* e *Myrcia sp.*, destacando suas respectivas descrições morfológicas, distribuição geográfica e características gerais. O segundo capítulo mostra o resultado do levantamento

bibliográfico realizado com a intenção de identificar os metabólitos secundários obtidos do gênero *Cissus*. O terceiro capítulo descreve a identificação dos constituintes voláteis das folhas e frutos de *Myrcia sp.* e dos constituintes fixos isolados do decocto das folhas verdes de *C. verticillata*, bem como dos constituintes obtidos do extrato etanólico das folhas secas desta espécie. O quarto capítulo relata a parte experimental realizada para o isolamento de metabólitos secundários de *C. verticillata*. O capítulo cinco contém o estudo da ação hipoglicemiante de *C. verticillata* através de testes realizados com a fração solúvel em metanol (CVFDSM), com a fração rica em tiramina (CVFDSM-F<sub>19-24</sub>) e com a tiramina, obtidos do decocto das folhas da planta. O capítulo seis expõe as conclusões do presente trabalho. O capítulo seguinte apresenta as constantes físicas das substâncias isoladas de *C. verticillata*. Por fim, encontram-se as referências bibliográficas utilizadas.



# Capítulo 1



## Considerações Botânicas

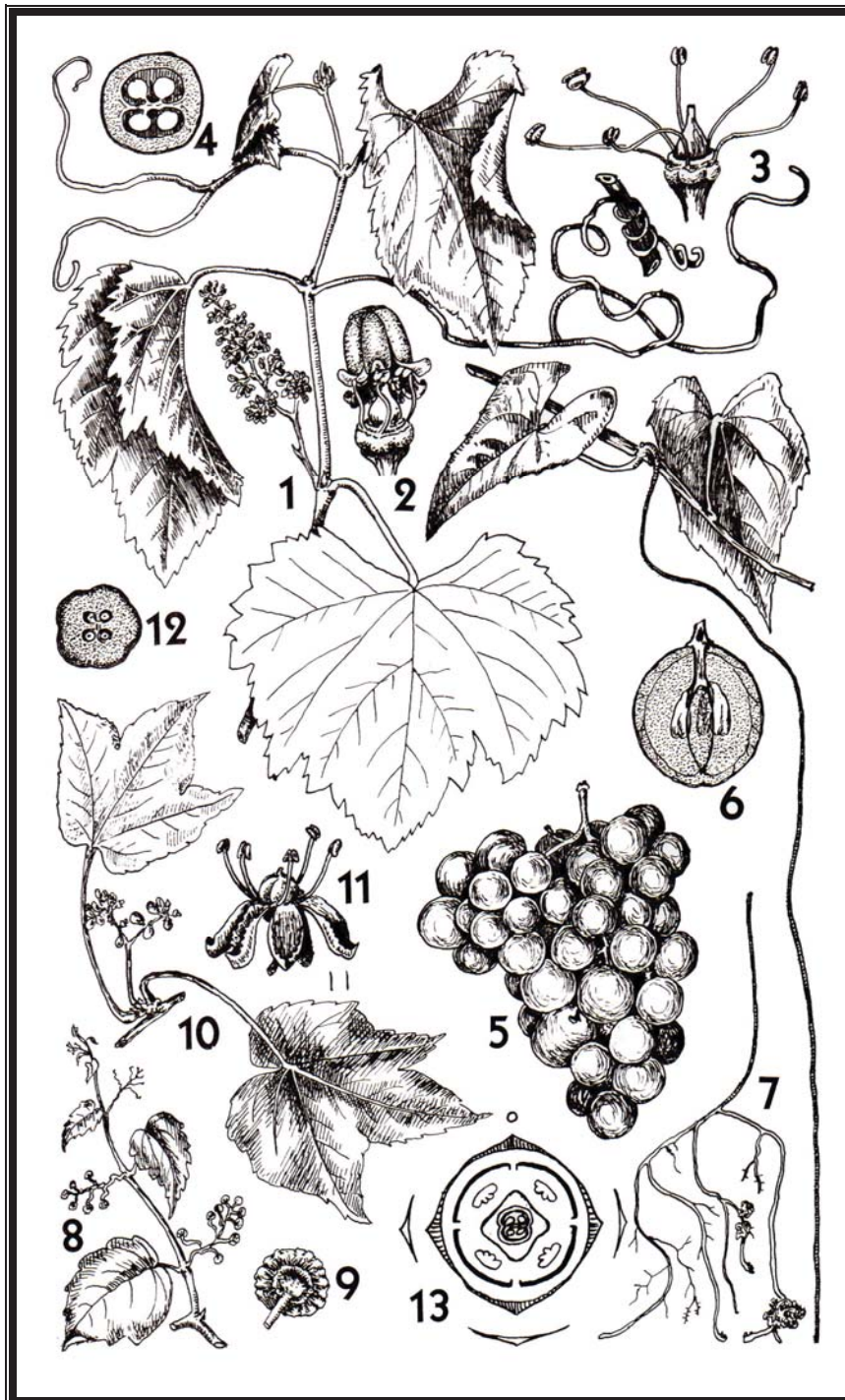
## 2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

### 2.1 Considerações Botânicas Sobre a Família Vitaceae

A família Vitaceae é composta por 13 gêneros e cerca de 800 espécies, distribuídos em regiões tropicais e temperadas. As espécies dessa família são lianas herbáceas e sublenhosas, que apresentam gavinhas opostas às folhas e em nós distintos. Apresentam estípulas auriculadas na base do pecíolo, geralmente decíduas. Possuem margem foliar com apículos provindos das nervuras secundárias ou terciárias e ápice mucronado (Fig. 1, Pág. 9). (Ribeiro *et al*, 1999).

Apresentam flores pequenas em inflorescências paniculadas, às vezes de colorido vivo (certas espécies de *Vitis* dos cerrados), cíclicas, tetrâmeras ou pentâmeras, de simetria radial, hermafroditas ou de sexo separado. Cálice pequeno. Pétalas às vezes se desprendendo em conjunto (certas espécies de *Vitis*). Androceu isômero. Ovário súpero, bicarpelar e bilocular, cada lóculo com até 2 óvulos. Possuem frutos do tipo baga (Fig. 1, Pág. 9). (Joly, 1998).

Algumas espécies de Vitaceae apresentam frutos muito importantes, as uvas, pois tais frutos são usados como matéria prima de vinhos e champanhes, por exemplo: *Vitis sp.* Alguns gêneros dessa família são usados como plantas ornamentais. (Ribeiro *et al*, 1999).



**Figura: 01** – Família Vitaceae, ilustrações de alguns de seus gêneros. Adaptada de Joly, 1998.

Ilustrações 1 a 6: *Vitis*: 1-Ramo florífero. 2-Flor abrindo-se. 3-Flor aberta. 4-Ovário em corte transversal. 5-Cacho de frutos. 6-Fruto cortado longitudinalmente.

Ilustração 7: *Cissus*. 4-Aspecto geral de um ramo com longa raiz adventícia, ramificada na extremidade.

Ilustrações 8 a 12: *Partenocissus*: 8-Ramo vegetativo. 9-Detalhe do apressório. 10-Ramo florífero. 11-Flor isolada. 12-Ovário em corte transversal.

Ilustrações 12 e 13: Diagramas florais de *Cissus*.

## 2.2 Considerações Botânicas Sobre o Gênero *Cissus*

No Brasil a família Vitaceae é representada apenas pelo gênero *Cissus*, com 42 espécies descritas para o país. Apesar da maioria destas crescerem em matas, o gênero está presente também em campos, cerrados e restingas. (Lombardi, 2000).

O gênero *Cissus* L. é o mais vasto da família Vitaceae, sendo constituído de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical (Corrêa, 1926).

Certas espécies do gênero *Cissus* são usadas como revestimento em paredes e se fixam por gavinhas modificadas em ventosas digitiformes. *Parthenocissus*, a conhecida cortina-japonesa com suas longas raízes adventícias são plantas ornamentais. (Joly, 1998).

## 2.3 Considerações Botânicas Sobre *Cissus verticillata*

*Cissus verticillata* conhecida popularmente como anil-trepador, cipó-pucá, cipó-puci, puçá, insulina, insulina vegetal, uva-brava, tinta-dos-gentios (Fig. 5, Pág. 12), cortina-de-pobre (Figs. 7 e 8, Pág. 13). Apresenta a seguinte sinonímia: *Cissus sicyoides* L., *Cissus canescens* Lam, *Cissus compressicaulis* Ruiz & Pav., *Cissus ovata* Lam., *Cissus smilacina* Kunth, *Cissus tamoides* Cambess., *Cissus umbrosa* Kunth, *Phoradendron verticillatum* (L.) Ducke, *Spondylantha aphylla* C. Presl, *Viscum verticillatum* L., *Vitis sicyoides* (L.) Baker (Nicolson et al, 1984; Lorenzi & Matos, 2002).

Ainda de acordo com Lorenzi & Matos (2002), *Cissus verticillata* pode ser descrita como: “Herbácea escandente ou trepadeira, perene, vigorosa, com ramos e folhas um tanto carnosas, com gavinhas opostas às folhas e raízes aéreas pêndulas, nativa da região norte do Brasil. Folhas simples, membranáceas, glabras, de 4-7 cm de comprimento. Flores pequenas, de cor creme, dispostas em inflorescências corimbiformes. Fruto drupa ovóide-globosa, de cor roxo-escura, com polpa carnosa, contendo uma única semente de cerca de 6 mm de comprimento. Multiplica-se tanto por sementes como pelo enraizamento dos ramos”.



**Figura 02:** Detalhe dos ramos com flores de *Cissus verticillata*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 03:** Detalhe dos ramos com frutos jovens de *Cissus verticillata*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 04:** Detalhe dos frutos jovens de *Cissus verticillata*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 05:** Detalhe dos frutos maduros de *Cissus verticillata*.  
Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 06:** Ramos e frutos de *Cissus verticillata*. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 07:** *Cissus verticillata* mostrando a sua fácil distribuição nas regiões tropicais. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 08:** *Cissus verticillata* com aspecto que justifica o nome popular “cortina-de-pobre”. Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).

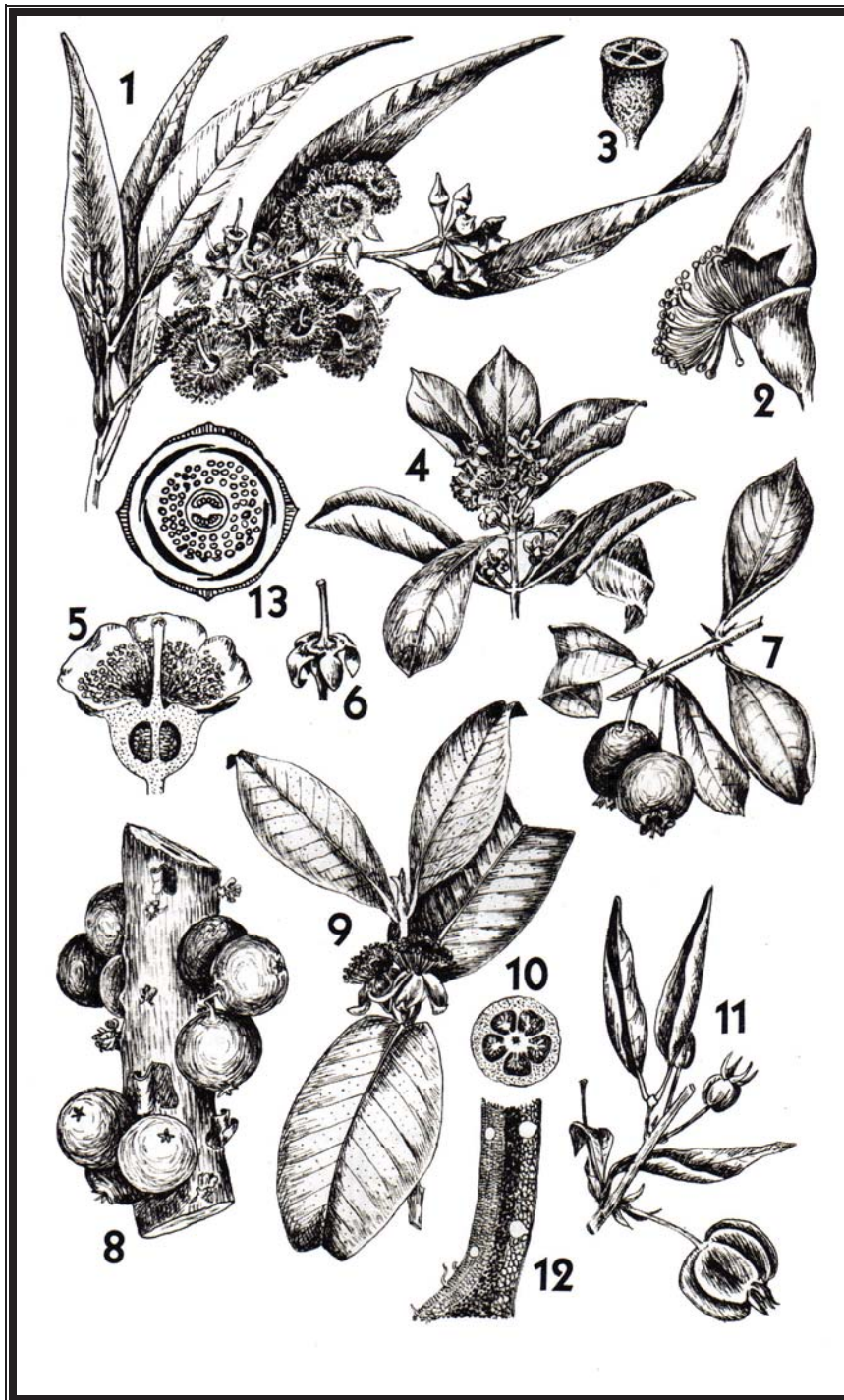
## 2.4 Considerações Botânicas Sobre a Família Myrtaceae

A família Myrtaceae está incluída na ordem Myrtiliflorae (Myrtales), é compreendida por cerca de 100 gêneros com aproximadamente 3.000 espécies, sendo a maior família da ordem Myrtiliflorae. Possui representantes em todo o mundo, porém possui dois grandes centros de dispersões, nas Américas e na Austrália. (Joly, 1998)

Ainda de acordo com Joly (1998) “são plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alterna ou oposta e às vezes oposta cruzada, com estípulas muito pequenas. Folhas com pontuações (glândulas oleíferas). Cauliflora frequente. Flores em geral brancas, ou às vezes vermelhas, efêmeras, hermafroditas, de simetria radial, em geral pentâmeras, mono ou diclamídeas, muitas vezes com um receptáculo bem desenvolvido. Corola às vezes suprimida e então cálice gamossépalo com deiscência transversal. Estames muito numerosos. Ovário súpero a semi-ínfero até ínfero, pentacarpelar e pentalocular, com muitos óvulos. Fruto baciforme ou capsular loculicida. Sementes muitas vezes mostrando poliembrionia. Às vezes sementes aladas” (Fig. 9, Pág. 15).

São exemplos freqüentes entre nós: “goiaba, araçá (*Psidium*), jaboticaba, ponhema, sabará (*Myrciaria*), pitanga, uvaia, cabeludinha, grumixana, cereja-nacional (*Eugenia*), cambucá (*Martiera*), guabiroba (*Campomanesia*), cambuci (*Paiveae*). Dentre as cultivadas merecem destaque: cravo ou craveiro-da-Índia, azeitona do Nordeste, Jambreiro, pimentada-Jamaica, eucalipto ou “calipe” dos caboclos” (Joly, 1998).





**Figura: 09** – Família Myrtaceae , ilustrações de alguns de seus gêneros. Adaptada de Joly, 1998.

Ilustrações 1 a 3: *Eucalyptus*: 1-Ramo florífero. 2-Botão na antese. 3-Fruto.

Ilustrações 4 a 7: *Campomanesia*. 4-Ramo com flores. 5-Flor cortada longitudinalmente. 6-Gineceu e cálice. 7-Ramo com frutos.

Ilustração 8: *Myrciaria*: Ramo com frutos.

Ilustrações 9, 10 e 12: *Psidium*: 9-Ramo florífero. 10-Ovário cortado transversalmente. 12.

Folha em corte transversal; note as glândulas.

Ilustração 11: *Eugenia*: Ramo com frutos.

Ilustração 13: Diagrama floral.

Os aspectos gerais de *Myrcia sp.*, bem como de seus frutos e flores são mostrados a seguir (Figs. 10 a 13, Págs. 16 e 17).



**Figura 10:** Aspecto geral de *Myrcia sp.* Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).



**Figura 11:** Detalhe dos ramos e frutos de *Myrcia sp* Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).

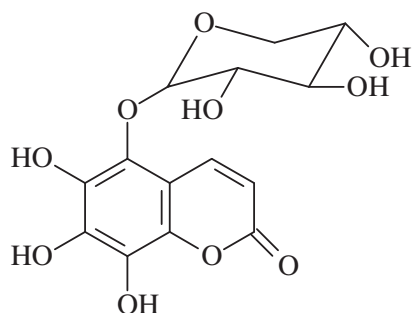


**Figura 12:** Detalhe dos frutos verdes e maduros de *Myrcia sp.*  
Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).

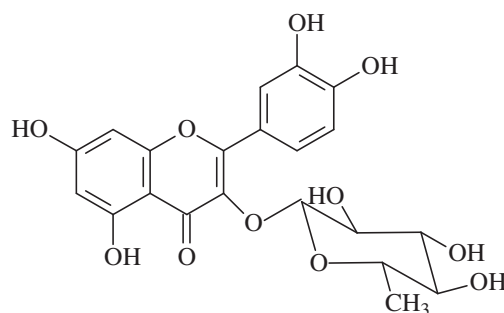


**Figura 13:** Detalhe das inflorescências de *Myrcia sp.* Fonte: Prof. Edilberto R. Silveira (DQOI-UFC).

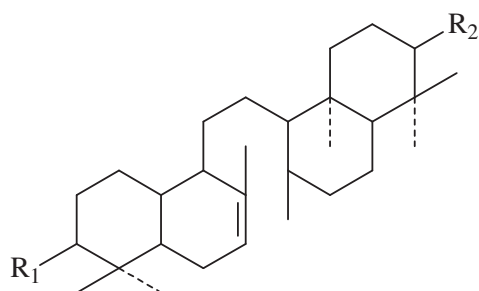
# Capítulo 2



**5,6,7,8-tetrahydroxi-cumarina-5- $\beta$ -xilopiranosídeo**

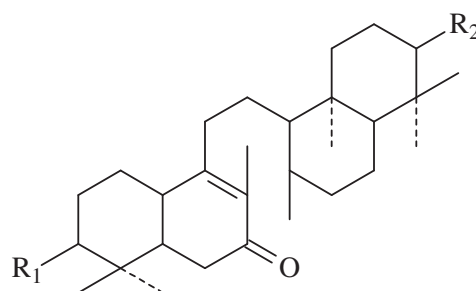


**Quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo**



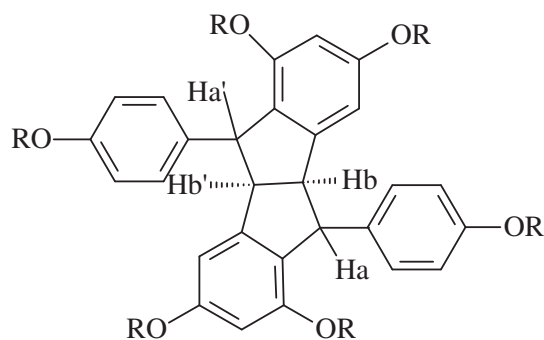
$R_1 = \alpha$  -OH;  $R_2 = \beta$  -OH

**Onocer-7-eno-3 $\alpha$ -21 $\beta$ -diol**



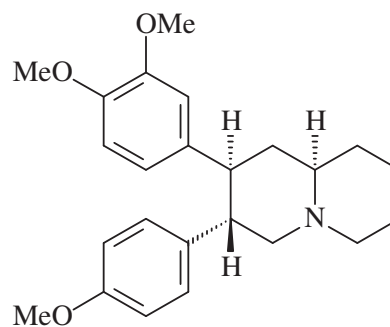
$R_1 = \beta$  -OH;  $R_2 = \alpha$  -OH

**7-oxo-onocer-8-eno-3 $\beta$ , 21 $\alpha$ -diol**



$R = H$ ;  $Ar(eq)$ ;  $H_{A,A'}$ (ax)

**Palidol**



**Kayawongine**

# Levantamento Bibliográfico

### 3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

#### 3.1 Metabólitos Secundários Isolados do Gênero *Cissus*

O presente levantamento bibliográfico contém as substâncias isoladas do gênero *Cissus* relatadas na literatura. A motivação para a escolha do tema, foi contribuir para o conhecimento farmacognóstico desse gênero, através do levantamento das substâncias isoladas até o presente momento a partir de suas diversas espécies.

Antocianinas, alcalóides, flavonóides, triterpenos e misturas de esteróides foram isolados do gênero *Cissus* (Nunez, 1975; Morton J., 1981; Al-Said *et al* 1991, Beltrame *et al*, 2001). Particularmente da espécie *Cissus sicyoides* foram isolados compostos fenólicos, cumarinas glicosídicas, alcalóides quinolizidínicos, flavonóides, terpenóides, estilbenos, triterpenóides e esteróides. (Saifah *et al*, 1983; Khan *et al*, 1986; Beltrame *et al*, 2002).

Um total de 51 substâncias foram identificadas na literatura como sendo isoladas do gênero *Cissus*, sendo essas substâncias provenientes de 04 de suas espécies, *Cissus sicyoides*, *Cissus quadrangularis*, *Cissus pallida* e *Cissus rheifolia*. A análise da literatura permite concluir que a distribuição destas substâncias ao longo da planta se dá em todas as partes, com destaque principal para as partes aéreas.

Muitos trabalhos encontram-se publicados na literatura tendo como objeto de estudo espécies do gênero *Cissus*, porém o que se observa é que a maioria deles se detém em estudar a atividade de extratos brutos e de decoctos de partes das plantas, destacando-se as seguintes, *Cissus quadrangularis* (39 artigos), *Cissus sicyoides* (14 artigos), *Cissus pallida* (01 artigo), *Cissus rheifolia* (03 artigos), *Cissus gum* (02 artigos), *Cissus stem Gum* (03 artigos), *Cissus populnea* (05 artigos), *Cissus pteroclada* Hayata (01 artigo), *Cissus glauca* Roxb (01 artigo), *Cissus gongylodes* (01 artigo), *Cissus assamica* (02 artigos), *Cissus rufescence gum* (01 artigo), *Cissus digitata* (01 artigo), *Cissus tendrils* (01 artigo), *Cissus quinquangularis* Chiov (02 artigos).

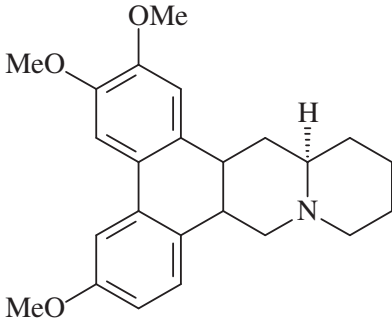
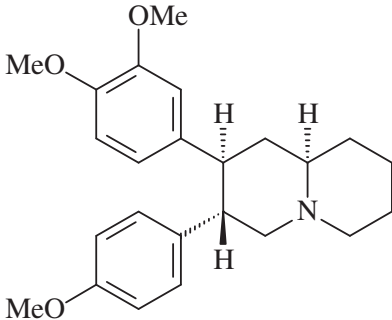
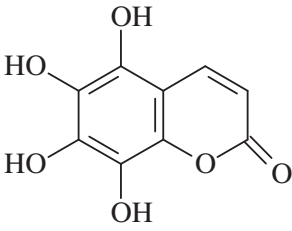
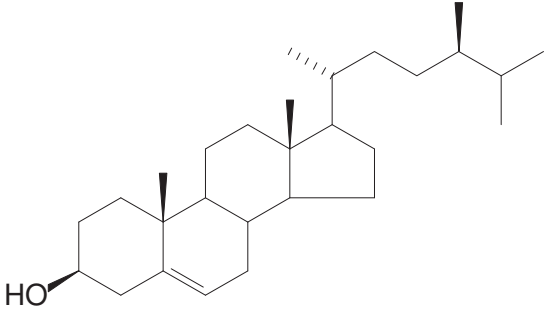
Pode-se constatar que das cerca de 400 espécies do gênero *Cissus*, encontram-se na literatura trabalhos publicados sobre 15 espécies citadas anteriormente, sendo a

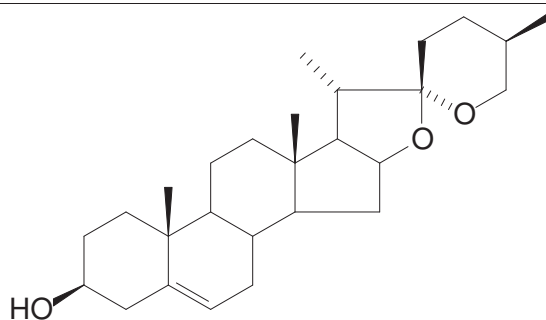
espécie *Cissus quadrangularis* objeto de estudo de mais da metade das publicações. Quanto à espécie que é objeto de estudo deste trabalho, *Cissus sicyoides*, 14 artigos encontram-se publicados. (Sen, S. P. 1964, Sen, S. P. 1966; Tinge *et al*, 1983; Virzo *et al*, 1980)

Os artigos publicados na literatura relacionados ao gênero *Cissus* investigam entre outros, a atividade anti-acne, antibactericida, helicobactericida, tratamento das trypanossomias, schistosomias, potencial antidiabético, atividade antioxidante, antimicrobial, defesa da mucosa gástrica, combate a radicais livres, agente antidiabético, atividade anti-alérgica, efeito antiosteoporótico, atividade hipoglicêmica, anti-lipêmica, anticonvulsivante, antiinflamatória, ação vasoconstritora. (Saifah, 1981; Saifah *et al*, 1983; Khan *et al*, 1986; Moura, 1986; Elisabetsky *et al*, 1988; Ivorra *et al*, 1989; Garcia *et al*, 1997; Pepato *et al*, 1998; Garcia *et al*, 2000; Lizama 2000; Saenz *et al*, 2000; Beltrame *et al*, 2002; Barbosa *et al*, 2002; Chidambara *et al*, 2003; Shirwaikar *et al*, 2003; Quílez *et al*, 2004; Viana *et al*, 2004; Jainu *et al*, 2004; Jainu *et al*, 2005; Jainu *et al*, 2006).

A Tabela 01, Pág. 21, apresenta as substâncias isoladas a partir das diversas espécies do gênero *Cissus*, destacando a estrutura, o nome da substância, a espécie, a parte da planta utilizada e a referência.

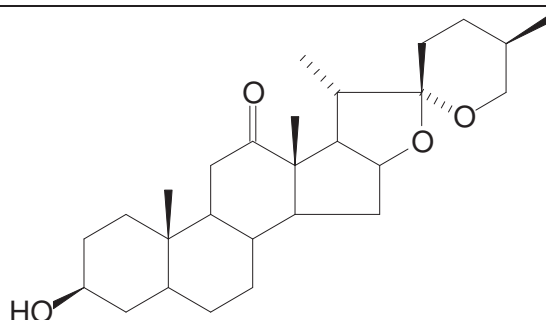
**Tabela 01:** Substâncias isoladas de espécies do gênero *Cissus*

| Estrutura/ Nome   | Classe/Espécie/Origem/Referência  |
|---|---|
|  <p data-bbox="459 712 675 745"><b>Criptoleurina (1)</b></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcalóide</li> <li>• <i>Cissus rheifolia</i></li> <li>• Folhas</li> <li>• SAIFAH <i>et al</i>, 1983</li> </ul>         |
|  <p data-bbox="459 1115 675 1149"><b>Kayawongina (2)</b></p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcalóide</li> <li>• <i>Cissus rheifolia</i></li> <li>• Folhas</li> <li>• SAIFAH <i>et al</i>, 1983</li> </ul>         |
|  <p data-bbox="475 1429 655 1462"><b>Sabandina (3)</b></p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumarina</li> <li>• <i>Cissus sicyoides</i></li> <li>• Partes aéreas</li> <li>• BELTRAME, <i>et al</i> 2002</li> </ul> |
|  <p data-bbox="464 1821 667 1854"><b>Campesterol (4)</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Esteróide</li> <li>• <i>Cissus rheifolia</i></li> <li>• Raízes</li> <li>• SAIFAH <i>et al</i>, 1987</li> </ul>         |



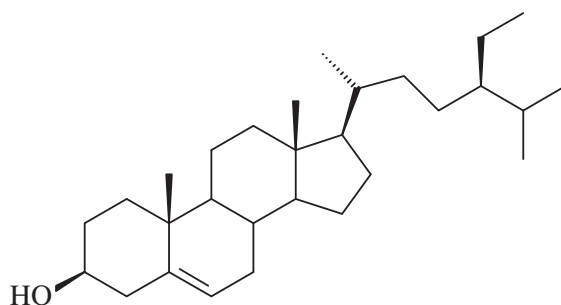
**Diosgenina(5)**

- Esteróide
- *Cissus sicyoides*
- Frutos
- TOLEDO *et al*, 1983
- Partes aéreas
- QUÍLEZ *et al*, 2004



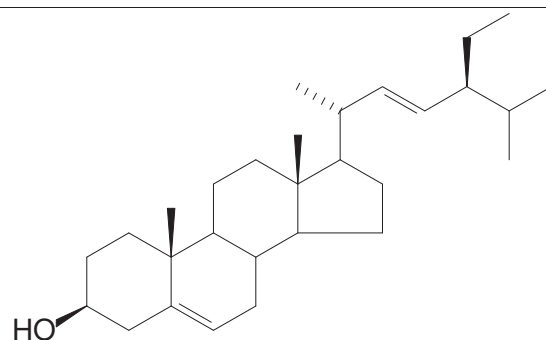
**Hecogenina (6)**

- Esteróide
- *Cissus sicyoides*
- Frutos
- TOLEDO *et al*, 1983
- Partes aéreas
- QUÍLEZ *et al*, 2004



**β-Sitosterol (7)**

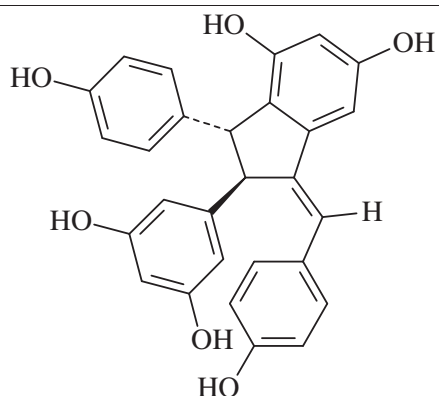
- Esteróide
- *Cissus sicyoides/ Cissus quadrangularis/ Cissus rheiifolia*
- Partes aéreas/ Partes aéreas/ Raízes
- BELTRAME, *et al* 2002; GUPTA e VERMA, 1991; SAIFAH *et al*, 1987



**Estigmasterol (8)**

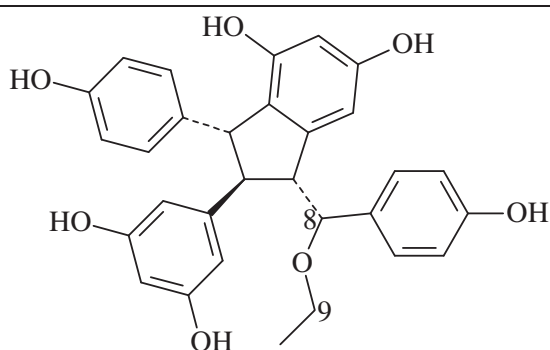
- Esteróide
- *Cissus rheiifolia*
- Raízes
- SAIFAH *et al*, 1987





**Quadrangularina A (9)**

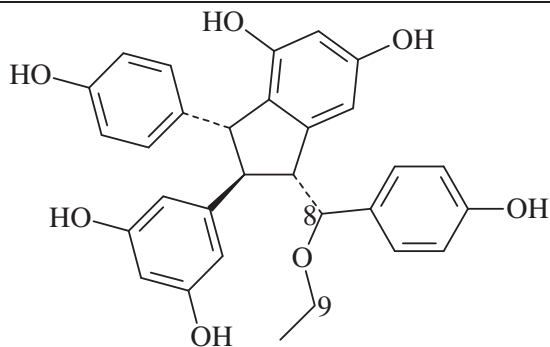
- Di-estilbeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Talos secos
- ADESANYA *et al*, 1999



8S

**Quadrangularina B (10)**

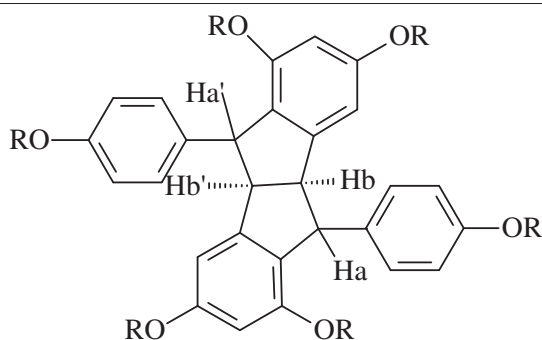
- Di-estilbeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Talos secos
- ADESANYA *et al*, 1999



8R

**Quadrangularina C (11)**

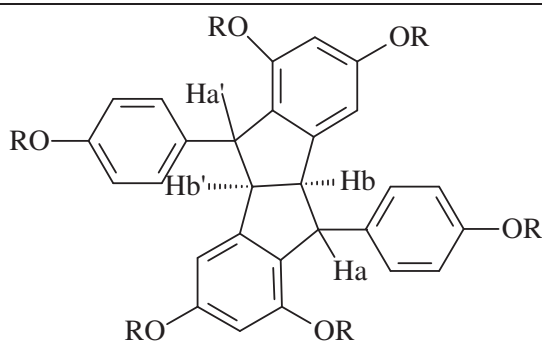
- Di-estilbeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Talos secos
- ADESANYA *et al*, 1999



R = H; Ar(eq); H<sub>a,a'</sub>(ax)

**Palidol (12)**

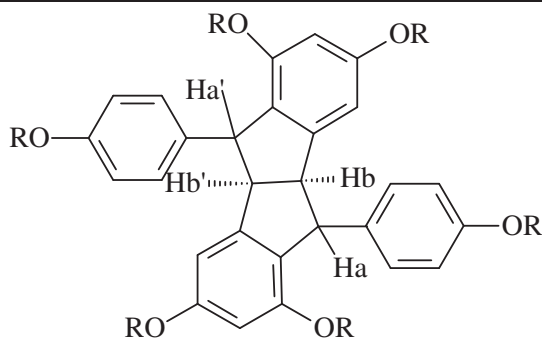
- Di-estilbeno
- *Cissus pallida*
- Talos secos
- KHAN *et al*, 1986



R = H; Ar(ax); H<sub>a,a'</sub>(eq)

**Enantiômero do Palidol (13)**

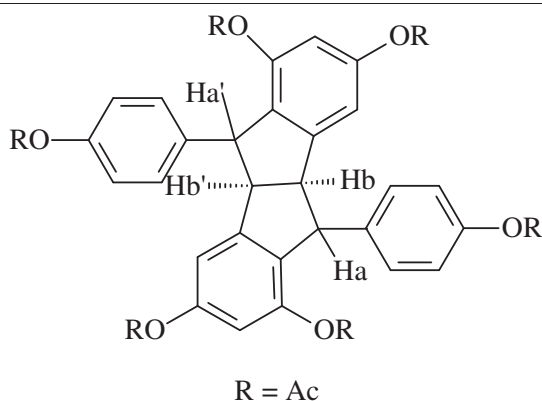
- Di-estilbeno
- *Cissus pallida*
- Talos secos
- KHAN *et al*, 1986



R = Me

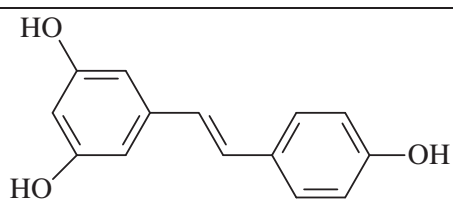
**Palidol hexametil éter (14)**

- Di-estilbeno
- *Cissus pallida*
- Talos secos
- KHAN *et al*, 1986



**Palidol hexa-acetato (15)**

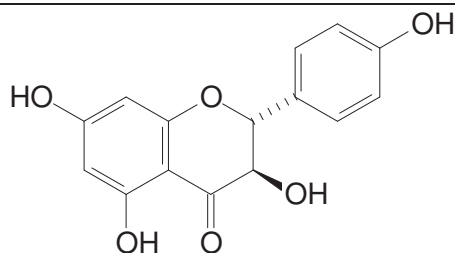
- Di-estilbeno
- *Cissus pallida*
- Talos secos
- KHAN *et al*, 1986



**Resveratrol**

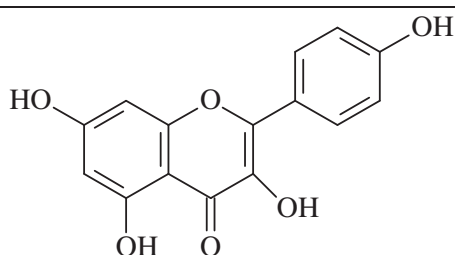
**(E)-3,4',5-trihidroxi-estilbeno (16)**

- Estilbeno-derivado
- *Cissus sicyoides*
- Partes aéreas
- AHMED *et al*, 2000
- QUÍLEZ *et al*, 2004



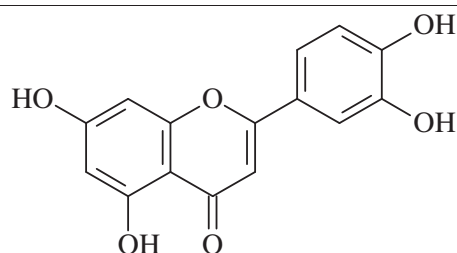
**Aromadetrina (17)**

- Flavonóide
- *Cissus rheifolia*
- Raízes
- SAIFAH *et al*, 1987



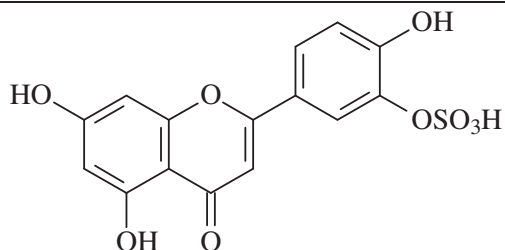
**Canferol (18)**

- Flavonóide
- *Cissus sicyoides*
- Folhas
- BARBOSA *et al*, 2002



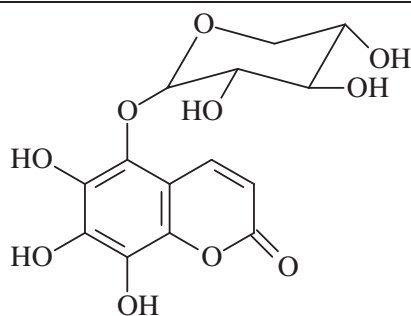
**Luteonina (19)**

- Flavonóide
- *Cissus sicyoides*
- Folhas
- BARBOSA *et al*, 2002



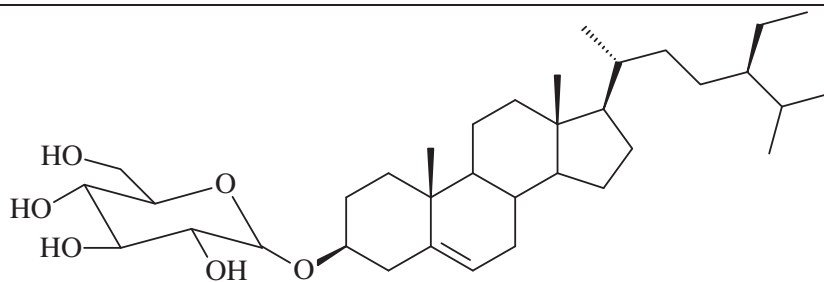
**Luteonina-3'-sulfato (20)**

- Flavonóide
- *Cissus sicyoides*
- Folhas
- BARBOSA *et al*, 2002



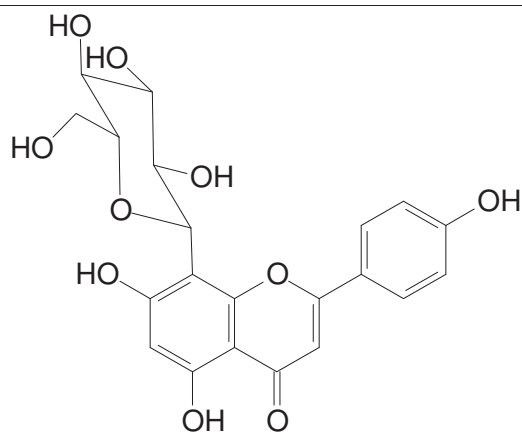
**5,6,7,8-tetrahydroxi-cumarina-5-β-xilopiranosídeo (21)**

- Heterosídeo cumarínico
- *Cissus sicyoides*
- Partes aéreas
- BELTRAME, *et al* 2002



**3-β-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol (22)**

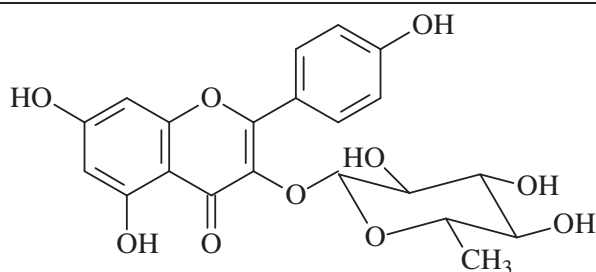
- Heterosídeo esteroidal
- *Cissus sicyoides*
- Partes aéreas
- BELTRAME, *et al* 2002



**Vitexina**

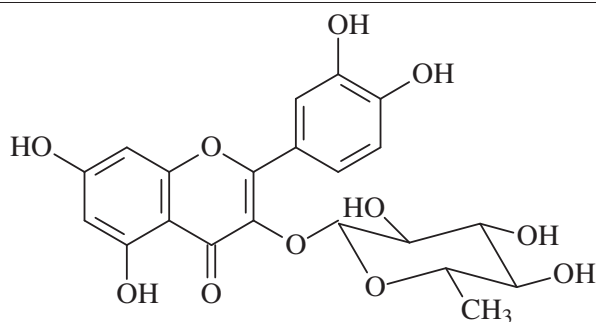
**Apigenina 8-C-glicopiranosídeo (23)**

- Heterosídeo flavonoídico
- *Cissus rheifolia*
- Folhas
- SAIFAH *et al*, 1983



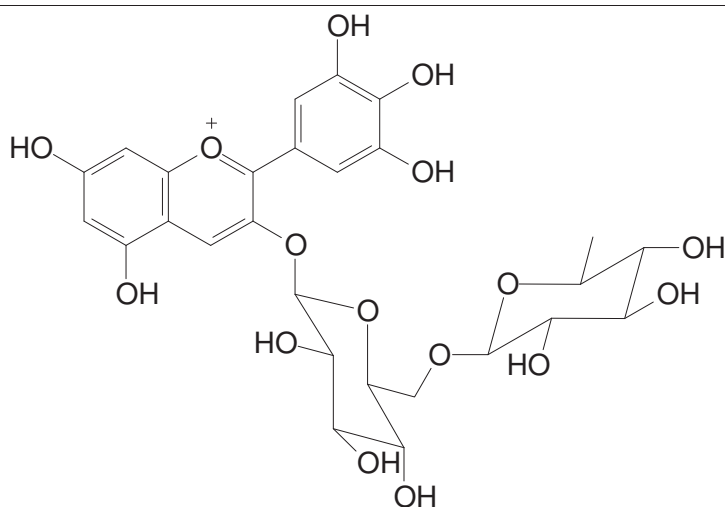
**Canferol 3- $\alpha$ -raminosídeo (24)**

- Heterosídeo flavonoídico
- *Cissus sicyoides*
- Partes aéreas
- BELTRAME *et al*, 2001



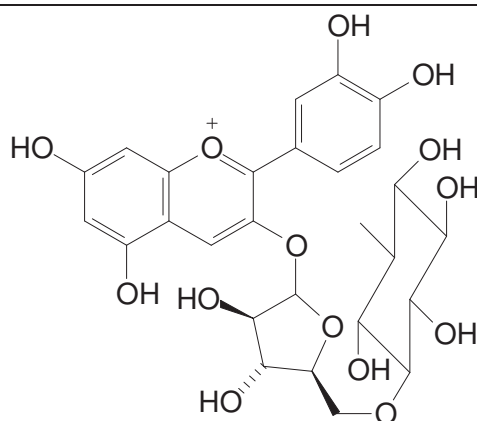
**Quercetina 3- $\alpha$ -raminosídeo (25)**

- Heterosídeo flavonoídico
- *Cissus sicyoides*
- Partes aéreas
- BELTRAME *et al*, 2001



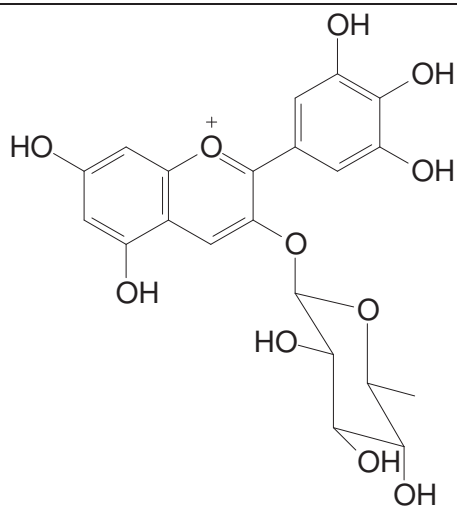
**Delfinidin-3-rutinosídeo (26)**

- Heterosídeo flavonoídico (antocianidina)
- *Cissus sicyoides*
- Frutos
- TOLEDO *et al*, 1983



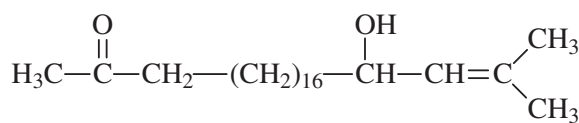
**Cianidin-3-raminosil-arabinose (27)**

- Heterosídeo flavonoídico (antocianidina)
- *Cissus sicyoides*
- Frutos
- TOLEDO *et al*, 1983



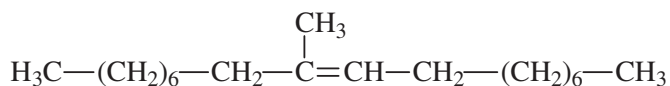
**Delfinidin-3-ramnosídeo (28)**

- Heterosídeo flavonoídico (antocianidina)
- *Cissus sicyoides*
- Frutos
- TOLEDO *et al*, 1983



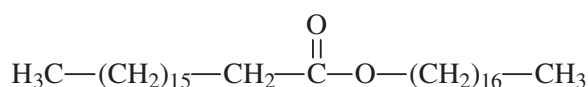
**4-Hidroxi-2-metil-tricos-2-en-22-ona (29)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



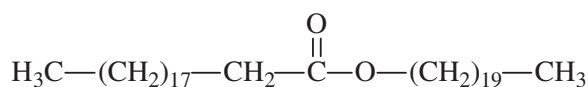
**9-Metil-octadec-9-eno (30)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



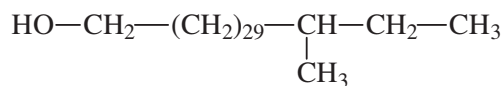
**Octadecanoato de heptadecila (31)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



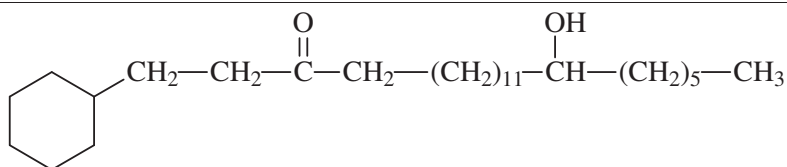
**Eicosanoato de eicosanila (32)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



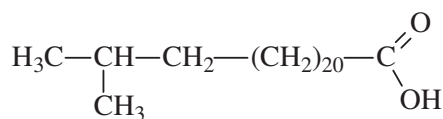
**31-Metil-tritriacontanol (33)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



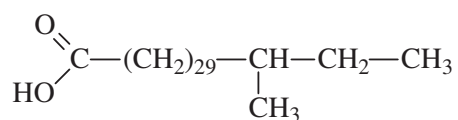
**7-Hidroxi-20-oxodocosanil-ciclohexano (34)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



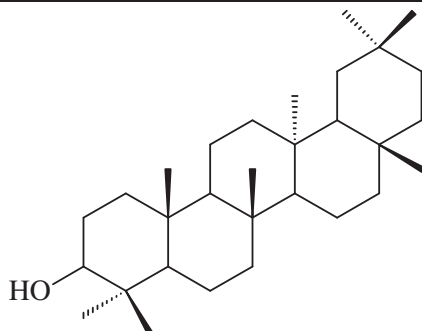
**Acido iso-pentacosanóico (35)**

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



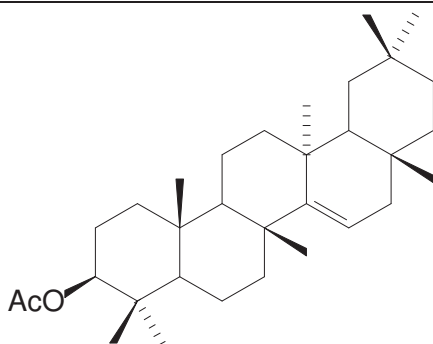
Ácido 31-metil-tritriacontanóico (36)

- Composto lipídico
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



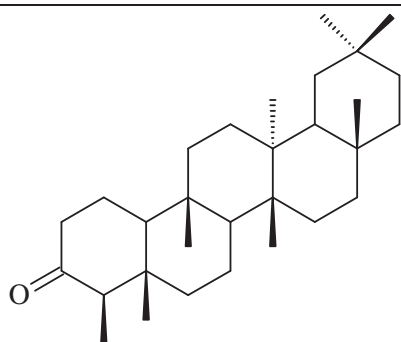
Taraxerol (37)

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



Taraxeril acetato (38)

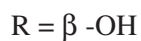
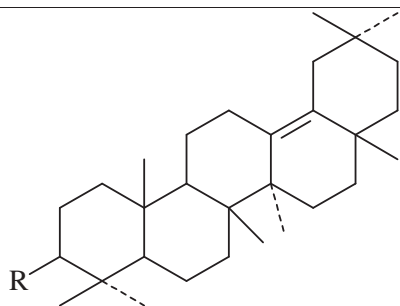
- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991



Friedelan-3-ona (39)

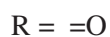
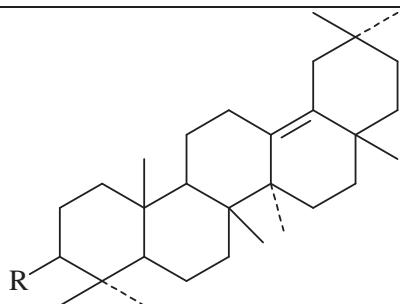
- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- GUPTA e VERMA, 1991





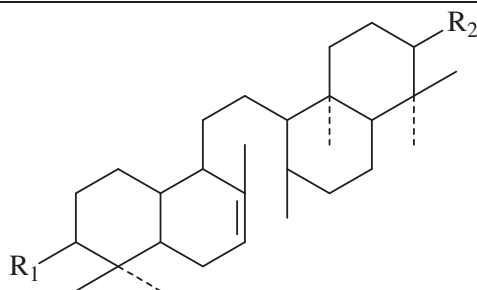
**$\delta$ -Amirina (40)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Partes aéreas e raízes
- BHUTANI *et al*, 1984
- MENTHA e BHUTANI, 2001



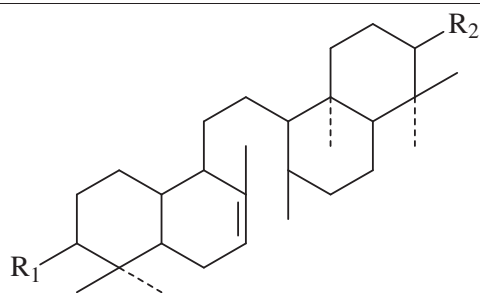
**$\delta$ -Amirona (41)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Partes aéreas e raízes
- BHUTANI *et al*, 1984
- MENTHA e BHUTANI, 2001



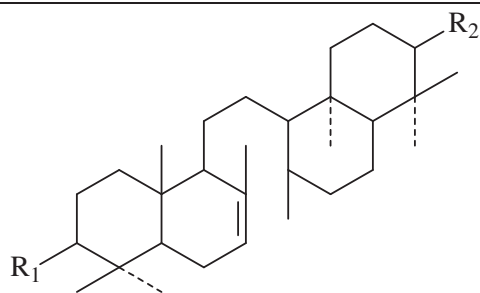
**Onocer-7-eno-3 $\alpha$ -21 $\beta$ -diol (42)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Partes aéreas e raízes
- BHUTANI *et al*, 1984
- MENTHA e BHUTANI, 2001



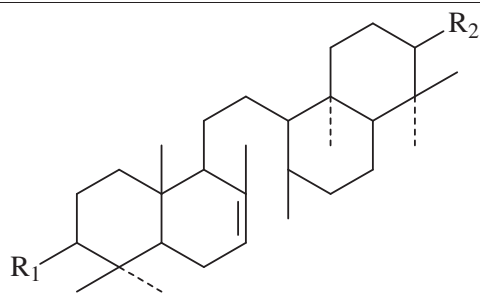
**Onocer-7-eno-3 $\beta$ ,21 $\alpha$ -diol (43)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Partes aéreas e raízes
- BHUTANI *et al*, 1984
- MENTHA e BHUTANI, 2001



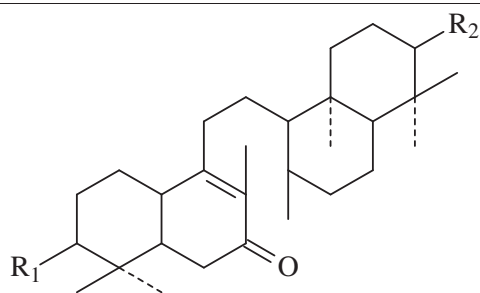
**Onocer-7-eno-3 $\alpha$ -21 $\beta$ -diol 3-acetato (44)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- BHUTANI *et al*, 1984



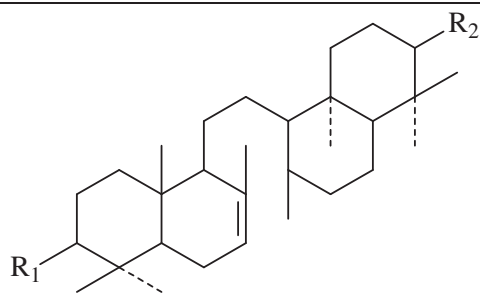
**Onocer-7-eno-3 $\beta$ -21 $\alpha$ -diol 3-acetato (45)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- BHUTANI *et al*, 1984



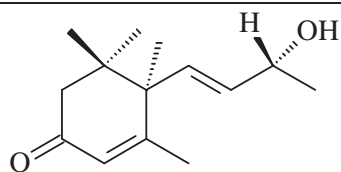
**7-oxo-onocer-8-eno-3 $\beta$ , 21 $\alpha$ -diol (46)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Partes aéreas e raízes
- GUPTA e VERMA, 1990
- MENTHA e BHUTANI, 2001



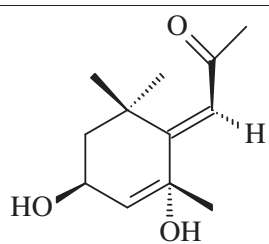
**Onocer-7-eno-3,21-diona (47)**

- Triterpeno
- *Cissus quadrangularis*
- Partes aéreas
- BHUTANI *et al*, 1984



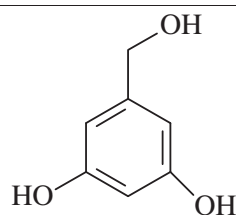
**Vomifoliol (48)**

- Terpenóide
- *Cissus rheifolia*
- Folhas
- SAIFAH *et al*, 1983

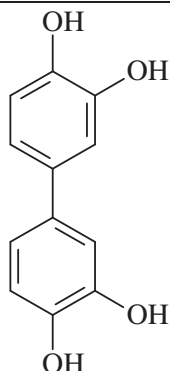


**Romalea aleno (49)**

- Terpenóide
- *Cissus rheifolia*
- Folhas
- SAIFAH *et al*, 1983

**3,5-dididroxibenzil álcool (50)**

- Outros compostos
- *Cissus sicyoides*
- Partes aéreas
- AHMED *et al*, 2000

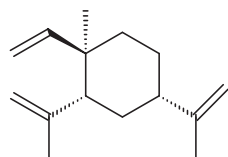
**3,3',4,4'-tetrahidroxi-bifenila (51)**

- Outros compostos
- *Cissus quadrangularis* Linn.
- Partes aéreas e raízes
- MENTHA e BHUTANI, 2001

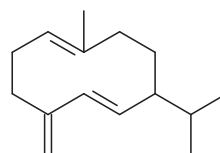
A análise da Tabela 01 permite concluir que das 51 substâncias descritas na literatura como tendo sido isoladas do gênero *Cissus*, são encontradas várias classes de produtos naturais: alcalóides (2), cumarina (1), esteróides (5), compostos derivados do estilbeno (8), flavonóides (4), heterosídeos (8), compostos lipídicos (8), triterpenos (11), terpenóides (2), outros compostos (2).

Conclui-se ainda que da espécie *Cissus verticillata* (*Cissus sicyoides*) foram isoladas 13 substâncias descritas na literatura: cumarina (1), esteróides (3), composto derivado do estilbeno (1), heterosídeo cumarínico (1), heterosídeo estereoidal (1), heterosídeos flavonoídicos (5) e outro composto (1).

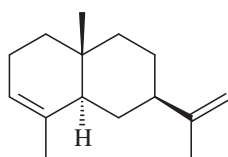
# Capítulo 3



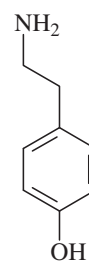
**$\beta$ -elemeno**



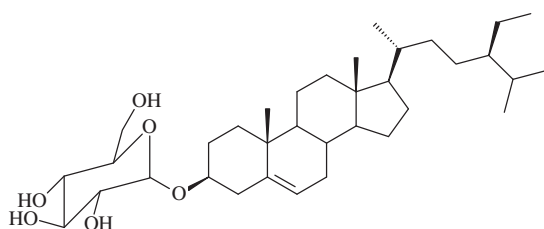
**germacreno D**



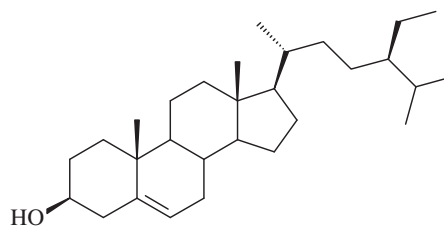
**$\alpha$ -selineno**



**tiramina**



**glicosídeo do  $\beta$ -sitosterol**



**$\beta$ -sitosterol**

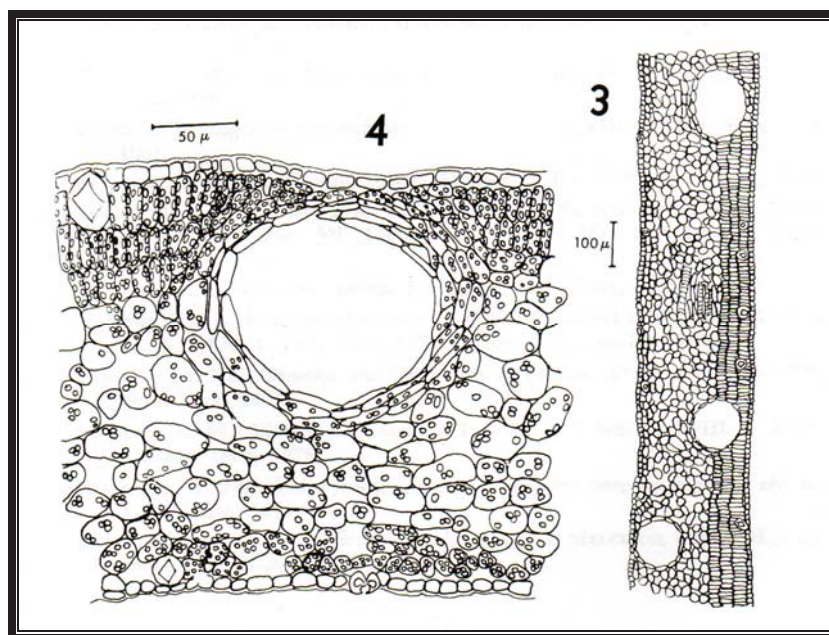
# Resultados e Discussão

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estudo dos constituintes voláteis de *Myrcia sp.*

O estudo dos constituintes químicos voláteis de *Myrcia sp.* foi realizado a partir dos óleos essenciais obtidos das folhas e dos frutos coletados no município de Amontada, no estado do Ceará, em janeiro de 2005.

Durante a coleta da planta, pôde-se observar um forte odor expelido pelas folhas, frutos e inflorescências, despertando um grande interesse para o estudo dos seus componentes químicos voláteis. Esse fato foi confirmado pela literatura, (Joly, 1998) que relata a existência de glândulas oleíferas nas folhas dos representantes da família Myrtaceae, como mostra a Figura abaixo (Fig. 14).



**Figura 14:** Cortes transversais da folha de Myrtaceae.

Ilustrações 3 e 4: Cortes transversais da folha de *Psidium sp.* (Myrtaceae) mostrando as glândulas.

A extração dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação com a utilização de aparelho doseador tipo Clevenger modificado por O. R. Gottlieb (Gottlieb e Magalhães, 1960).

As análises dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas utilizando cromatógrafo gás-líquido acoplado a espectrômetro de massa (CGL/EM). A análise quantitativa foi realizada através de CGL/FID. Os óleos essenciais obtidos das folhas e dos frutos de *Myrcia sp.* foram denominados de GAOFOLHAS e GAOFRUTOS, respectivamente.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada através da determinação dos índices de Kovats, por regressão linear utilizando-se o Excel 2003, pesquisa em espectroteca (Alencar 1990) e comparação com dados da literatura (Adams, 2001). A correção dos índices de Kovats foi efetuada para GAOFOLHAS através de regressão linear do gráfico construído com os tempos de retenção (25,033; 29,775; 30,542) e índices de Kovats tabelados. A equação da reta obtida para a regressão linear foi:  $Y = 31,026X + 561,32$ ; o seu fator de correção foi  $R^2 = 1$ . Para GAOFRUTOS foram escolhidos três picos com os seguintes tempos de retenção (25,042; 29,750; 30,033) e índices de Kovats tabelados. A equação da reta obtida para a regressão linear foi:  $Y = 30,952X + 563,02$ ; o seu fator de correção foi  $R^2 = 0,9998$ .

O óleo essencial das folhas de *Myrcia sp.*, denominado de GAOFOLHAS, foi obtido a partir de 900 g de material, resultando em 5,25 g de óleo (rendimento de 0,58% em massa). Embora seu cromatograma (Fig. 15, Pág. 40) tenha apresentado vários picos, 15 deles, relativos aos seus principais constituintes, foram registrados e tiveram seus espectros de massa obtidos. Destes, 13 (94,5%) foram identificados e encontram-se na Tabela 02, Pág. 39. Entre os compostos identificados todos são sesquiterpenos, tendo o  $\beta$ -elemeno (23,38%), o germacreno D (12,87%) e o  $\alpha$ -cadinol (15,20%) como majoritários.

O óleo essencial dos frutos de *Myrcia sp.*, denominado de GAOFRUTOS, foi obtido a partir de 580 g de material, resultando em 2,5461 g de óleo (rendimento de 0,44% em massa). 12 picos, relativos aos constituintes principais foram registrados no cromatograma do óleo (Fig. 16, Pág. 40), dos quais 11 (99,05%) foram identificados (Tabela 02, Pág. 39). Todos os

compostos identificados são sesquiterpenos, tendo o  $\beta$ -elemeno (29,65%), o *trans*-cariofileno (9,97%), o germacreno D (28,28%) e o  $\alpha$ -selineno (8,11%) como majoritários.

Foi realizado ainda o procedimento para a extração do óleo essencial dos talos de *Myrcia sp.* utilizando-se 650 g de material, que resultou em quantidade não significativa de óleo essencial.

Os óleos essenciais das folhas (GAOFOLHAS) e dos frutos (GAOFRUTOS) de *Myrcia sp.*, mostraram ter sua composição química com semelhanças marcantes, como o fato do  $\beta$ -elemeno ser o constituinte majoritário nestes dois óleos. Oito, dos onze constituintes identificados no óleo proveniente dos frutos, estão presentes também no óleo proveniente das folhas, com teores aproximados. Entre as principais diferenças entre os dois óleos, destacam-se o fato de somente o óleo essencial das folhas possuir o  $\alpha$ -cadinol, sendo tal substância o segundo componente majoritário (15,20%), além do fato de 5 constituintes, das 13 substâncias identificadas no óleo essencial das folhas não terem sido identificados no óleo essencial dos frutos.

São apresentados ainda os cromatogramas (CGL-FID) (Figs. 17 e 18, Pág. 41) que foram utilizados na análise quantitativa dos componentes dos óleos de *Myrcia sp.* e os espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500MHz) (Figs. 19 e 20, Pág. 42) que serviram para uma análise preliminar de GAOFOLHAS e GAOFRUTOS.

As Figuras 21 - 36 (Págs. 43 - 48) mostram os espectros de massa dos compostos químicos voláteis identificados nos óleos essenciais provenientes das folhas (GAOFOLHAS) e no óleo essencial proveniente dos frutos (GAOFRUTOS), com suas respectivas estruturas.

A Tabela 02, Pág. 39 mostra os constituintes químicos identificados nos óleos essenciais provenientes das folhas (GAOFOLHAS) e dos frutos (GAOFRUTOS) de *Myrcia sp.*, destacando os quatro constituintes majoritários desses óleos que representam respectivamente 60,89% e 75,93% dos seus constituintes.



**Tabela 02:** Percentuais dos componentes químicos (%) dos óleos essenciais das folhas (GAOFOLHAS) e frutos (FAOFRUTOS) de *Myrcia sp.*

| COMPONENTES                         | I.K  | GAOFOLHAS    | GAOFRUTOS    |
|-------------------------------------|------|--------------|--------------|
| $\delta$ -elemeno                   | 1338 | 3,87         | 5,23         |
| <b><math>\beta</math>-elemeno</b>   | 1391 | <b>23,38</b> | <b>29,65</b> |
| <i>trans</i> -cariofileno           | 1419 | 6,25         | <b>9,97</b>  |
| $\alpha$ -guaiano                   | 1440 | —            | 1,20         |
| $\alpha$ -humuleno                  | 1455 | 3,24         | 4,01         |
| $\beta$ -chamigreno                 | 1478 | 3,58         | —            |
| <b>germacreno D</b>                 | 1485 | <b>12,87</b> | <b>28,20</b> |
| $\beta$ -selineno                   | 1490 | 5,81         | 3,39         |
| $\beta$ -guaiano                    | 1493 | 1,15         | —            |
| <b><math>\alpha</math>-selineno</b> | 1498 | <b>9,44</b>  | <b>8,11</b>  |
| $\alpha$ -Z-bisaboleno              | 1507 | 2,91         | —            |
| germacreno A                        | 1509 | —            | 5,63         |
| $\delta$ -cadineno                  | 1523 | 3,74         | 1,74         |
| germacreno B                        | 1561 | —            | 1,92         |
| <i>epi</i> - $\alpha$ -murolol      | 1642 | 2,71         | —            |
| <b><math>\alpha</math>-cadinol</b>  | 1654 | <b>15,20</b> | —            |
| Total                               | -    | 94,15%       | 99,05%       |

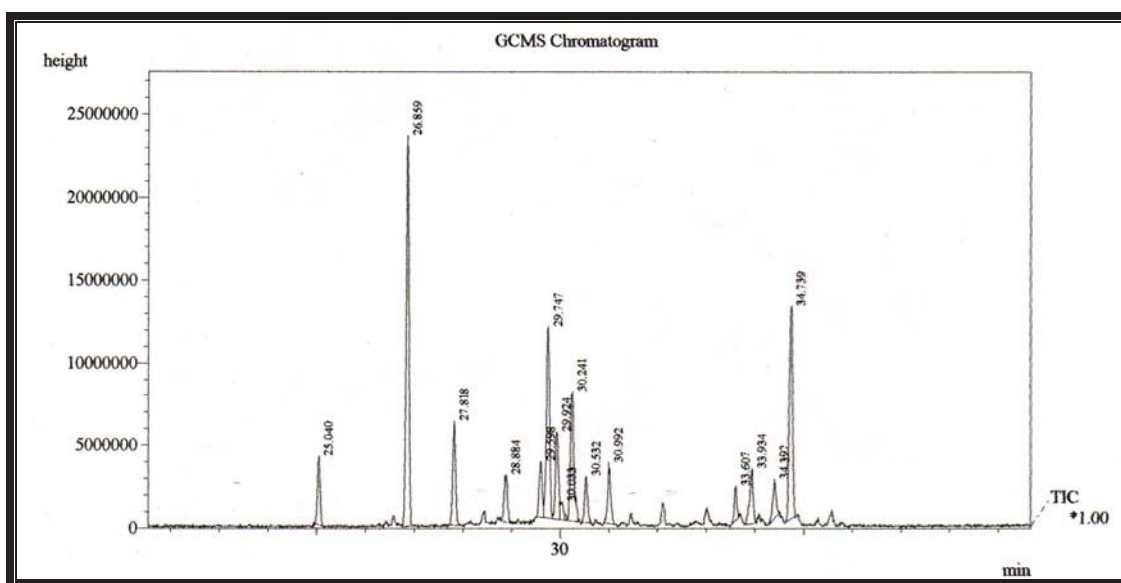


Figura 15: Cromatograma (CGL-EM) dos constituintes voláteis das folhas (GAOFOLHAS) de *Myrcia sp.*

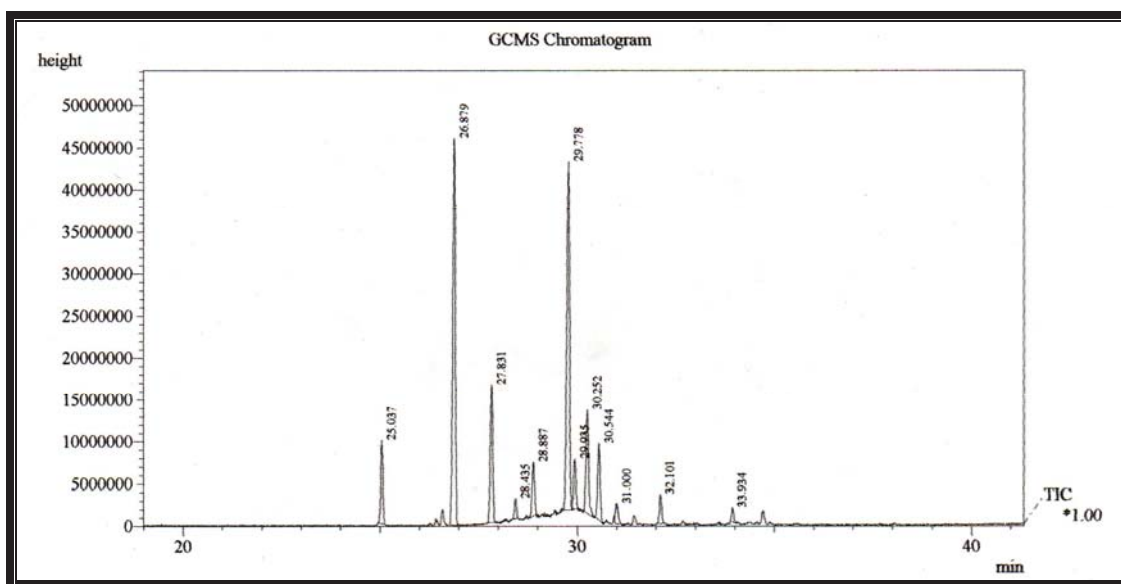


Figura 16: Cromatograma (CGL-EM) dos constituintes voláteis dos frutos (GAOFRUTOS) de *Myrcia sp.*

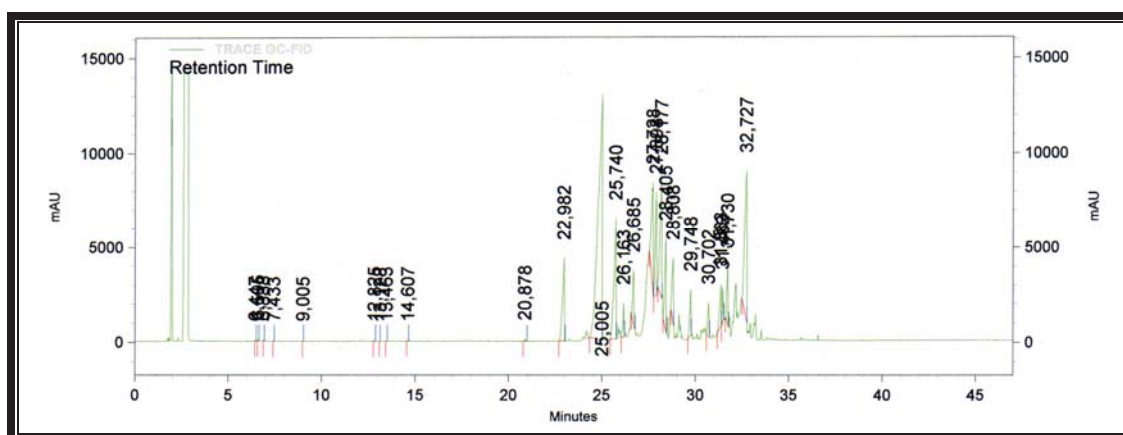


Figura 17: Cromatograma (CGL-FID) dos constituintes voláteis das folhas (GAOFOLHAS) de *Myrcia sp.*

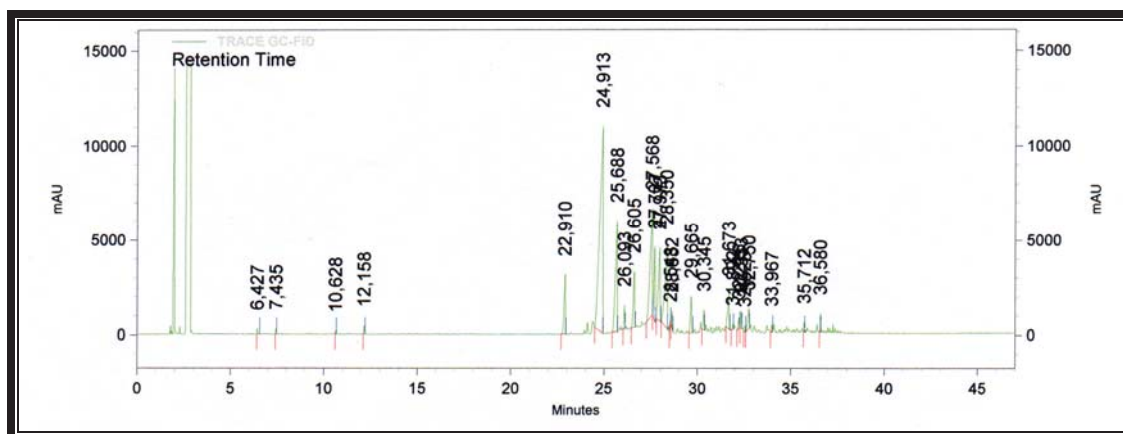


Figura 18: Cromatograma (CGL-FID) dos constituintes voláteis dos frutos (GAOFRUTOS) de *Myrcia sp.*

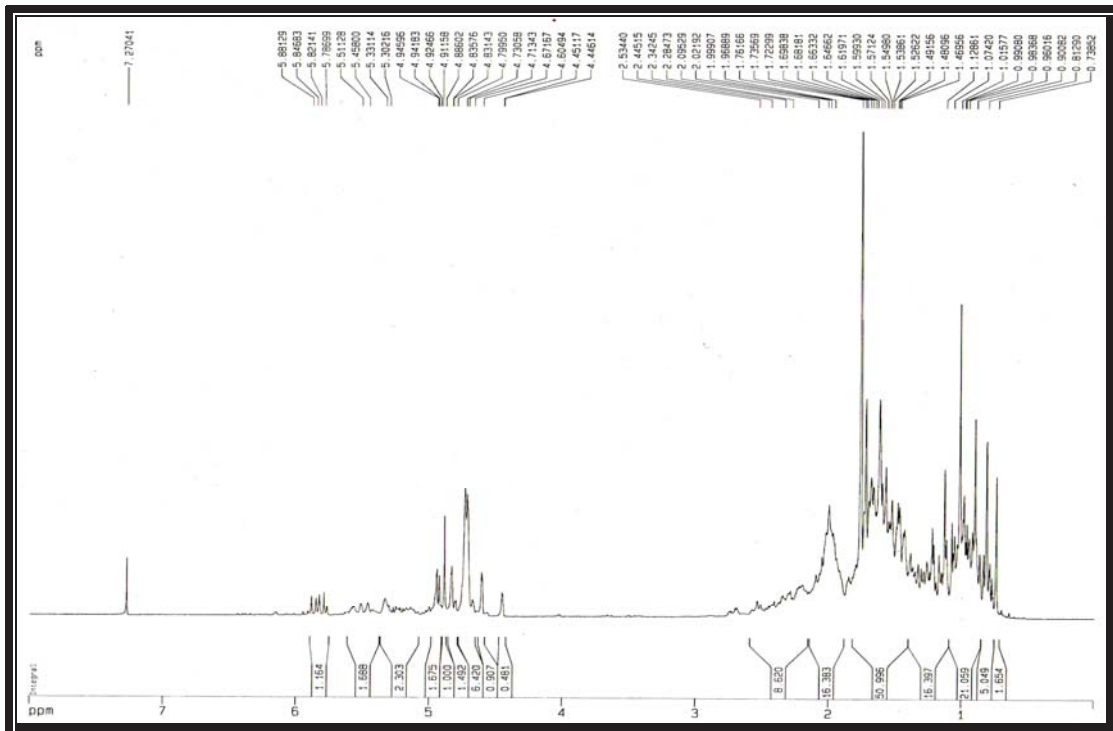


Figura 19: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) dos constituintes voláteis das folhas (GAOFOLHAS) de *Myrcia* sp.

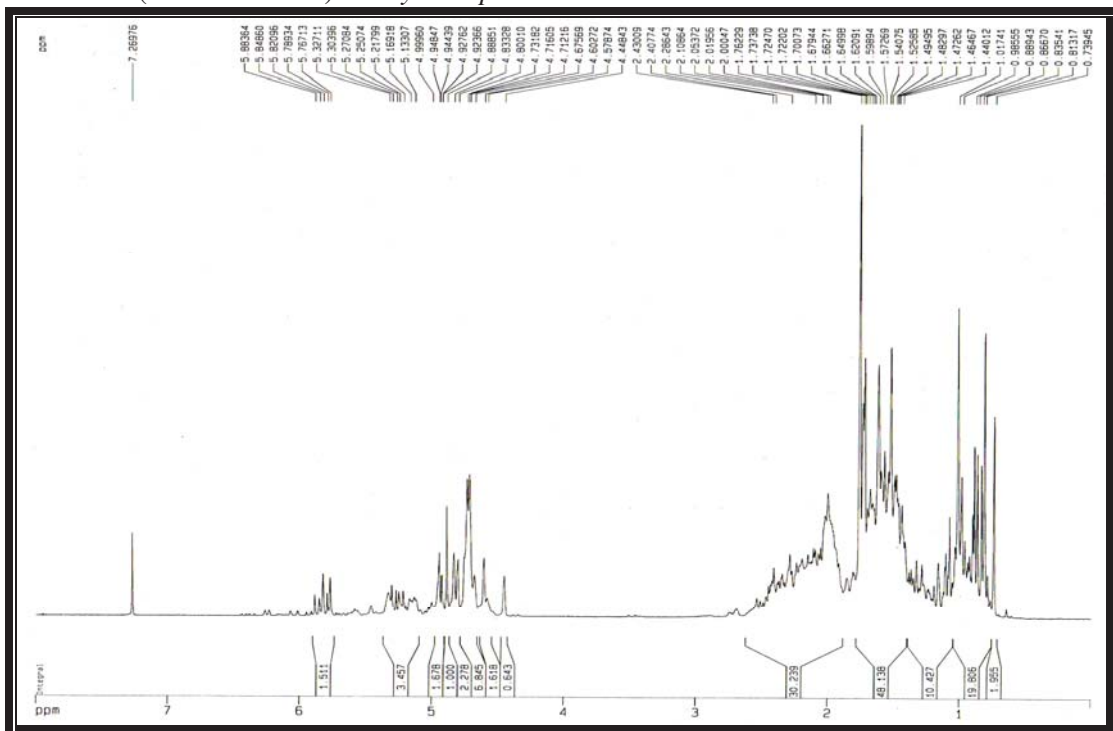


Figura 20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) dos constituintes voláteis dos frutos (GAODFRUTOS) de *Myrcia* sp.

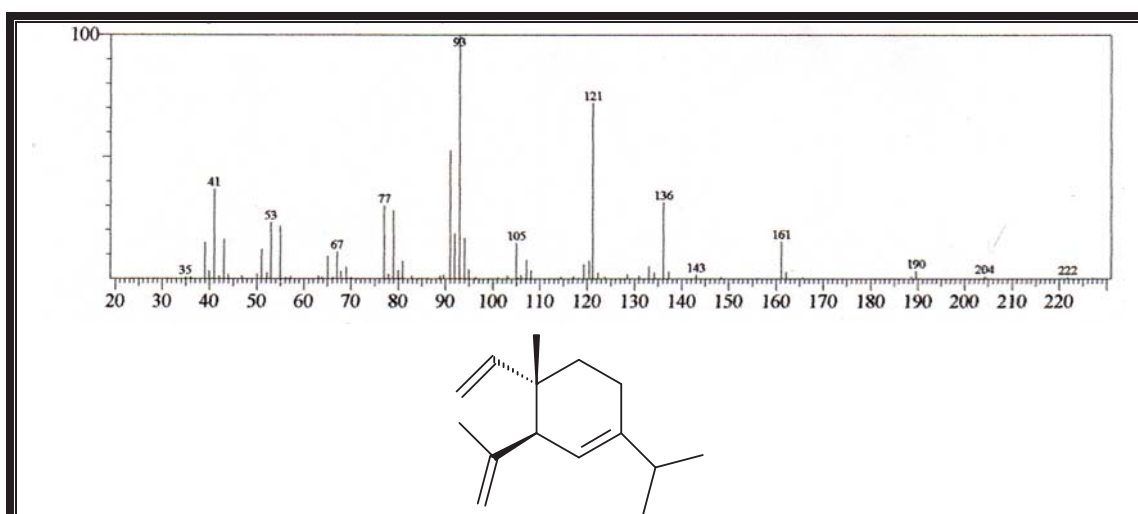


Figura 21: Espectro de massa do  $\delta$ -elemento.

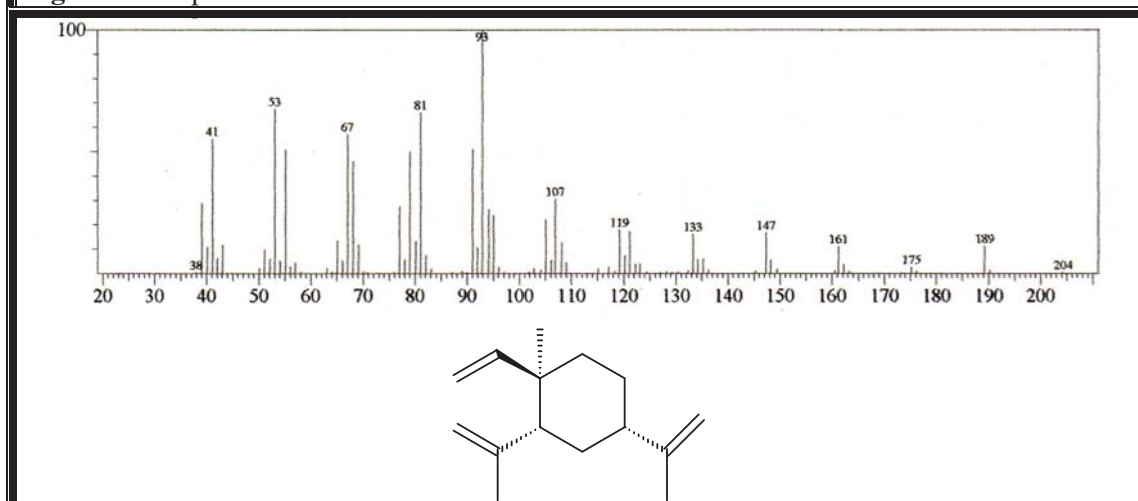


Figura 22: Espectro de massa do  $\beta$ -elemento.

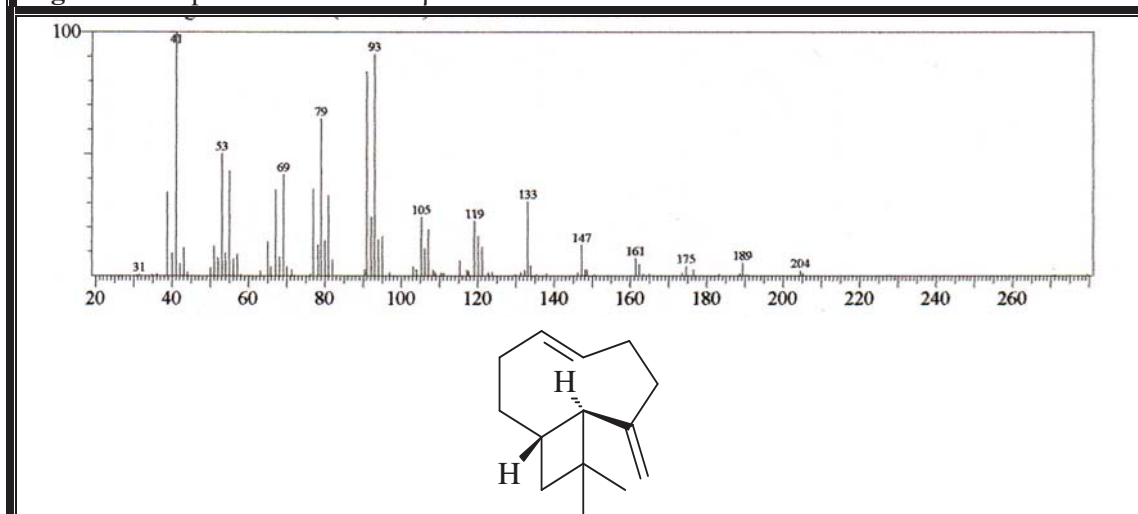


Figura 23: Espectro de massa do *trans*-cariofileno.

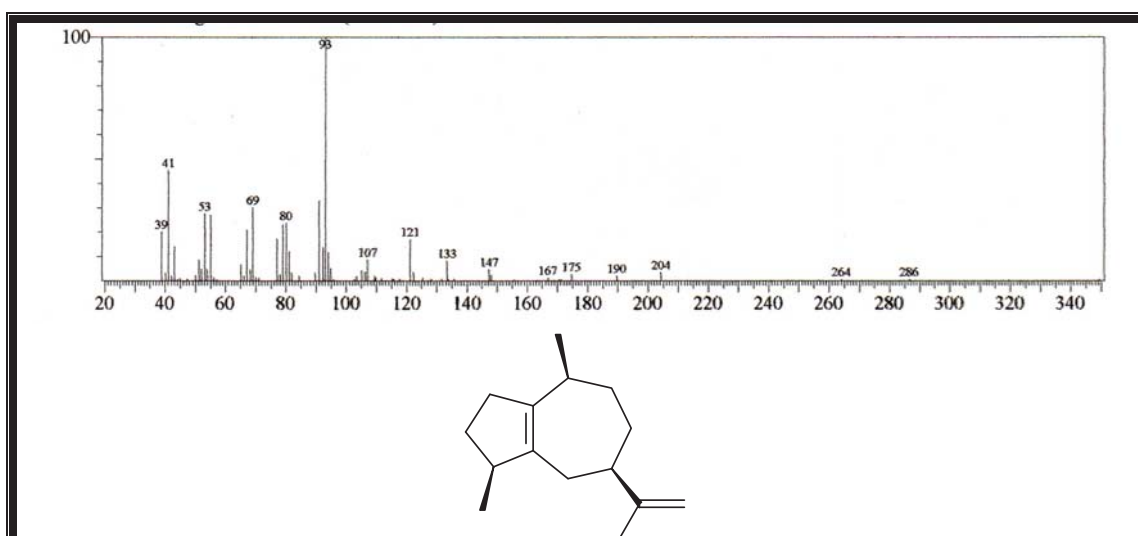


Figura 24: Espectro de massa do  $\alpha$ -guaieno.

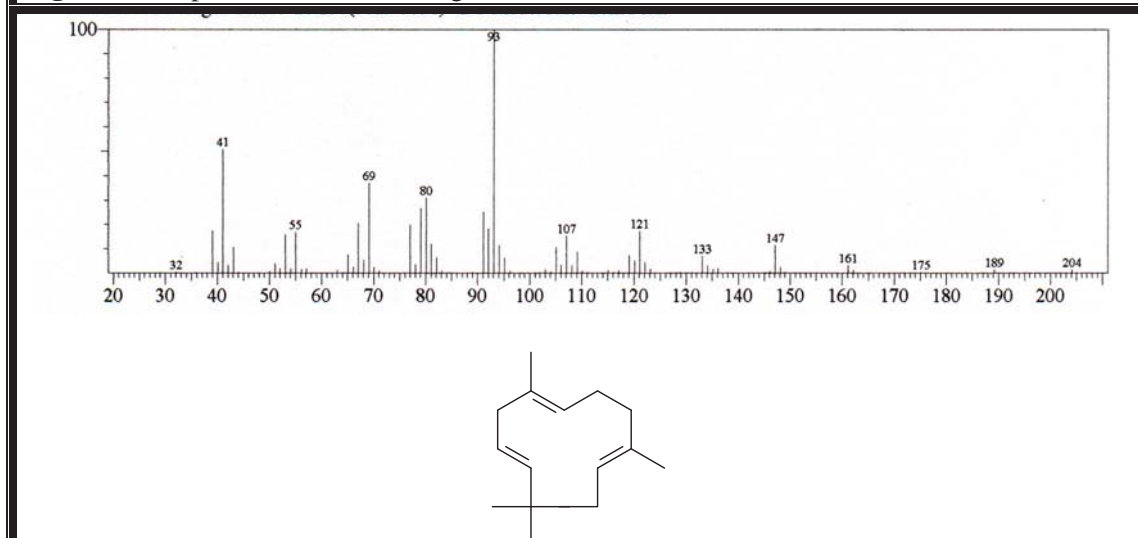


Figura 25: Espectro de massa do  $\alpha$ -humuleno.

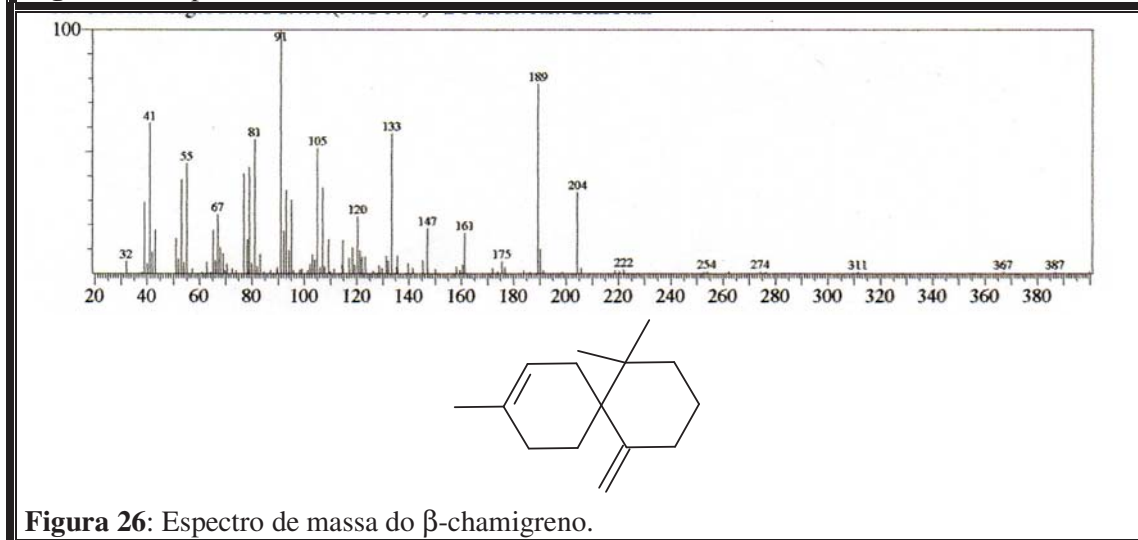
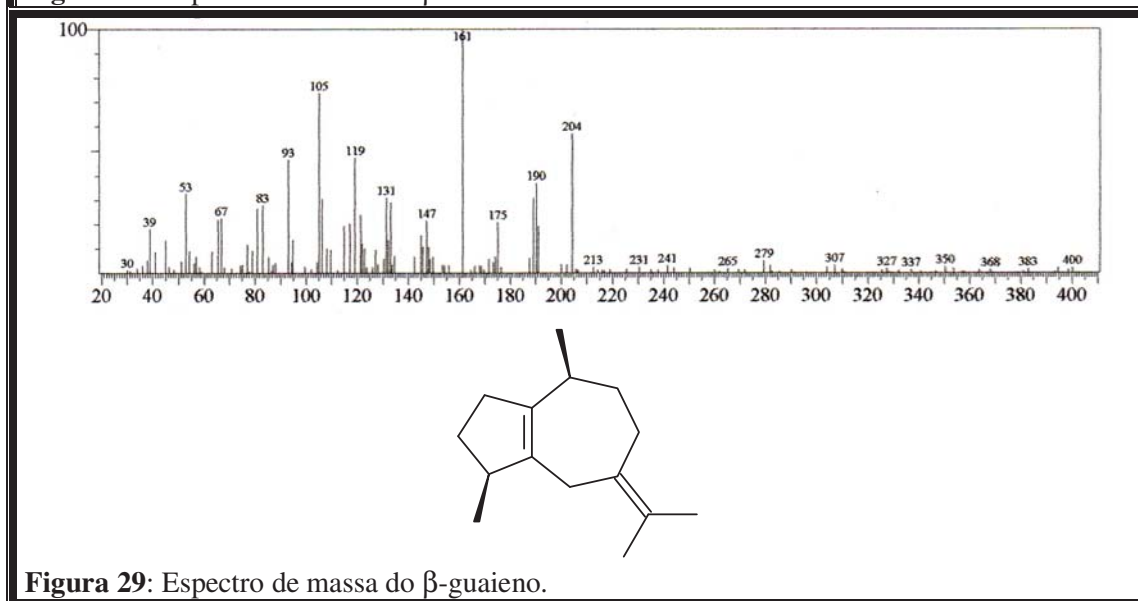
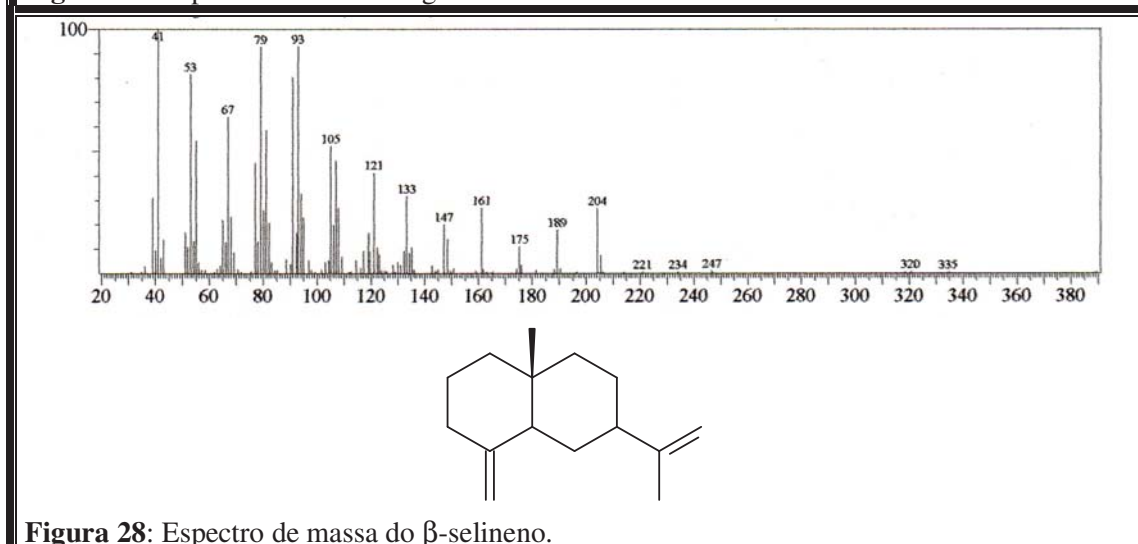
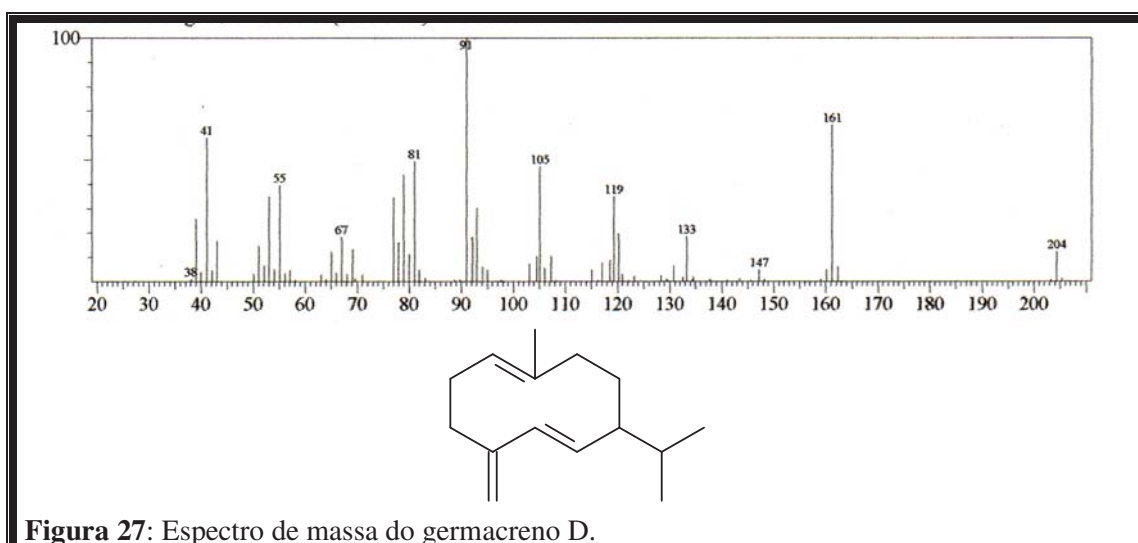
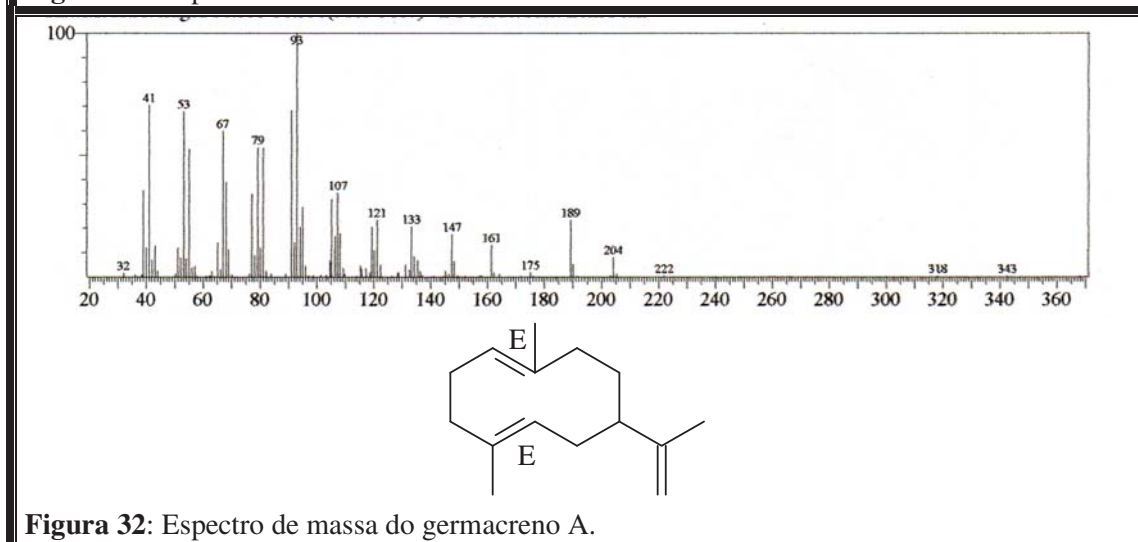
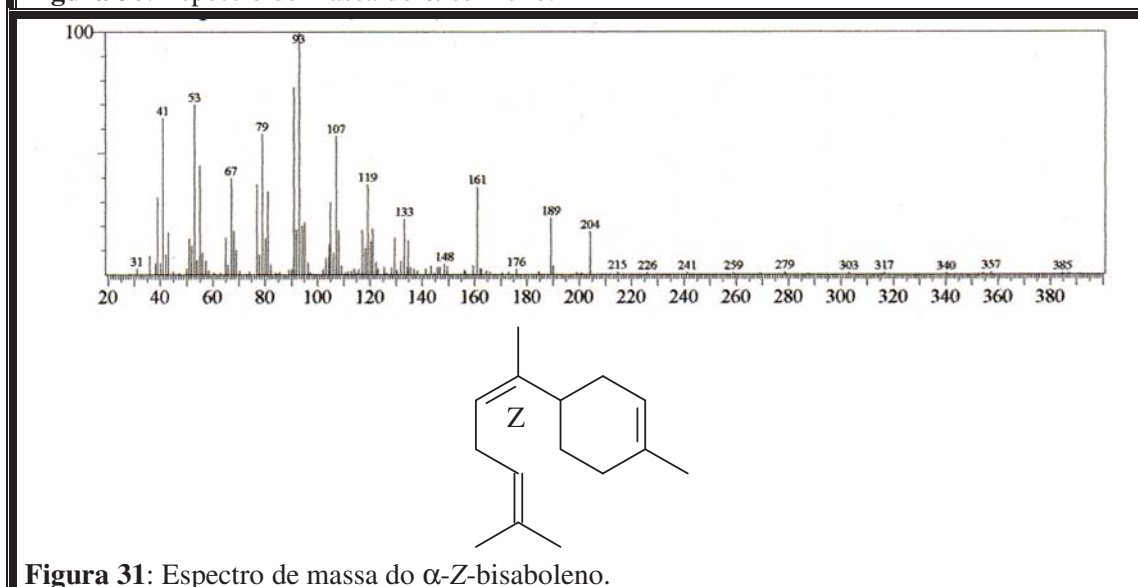
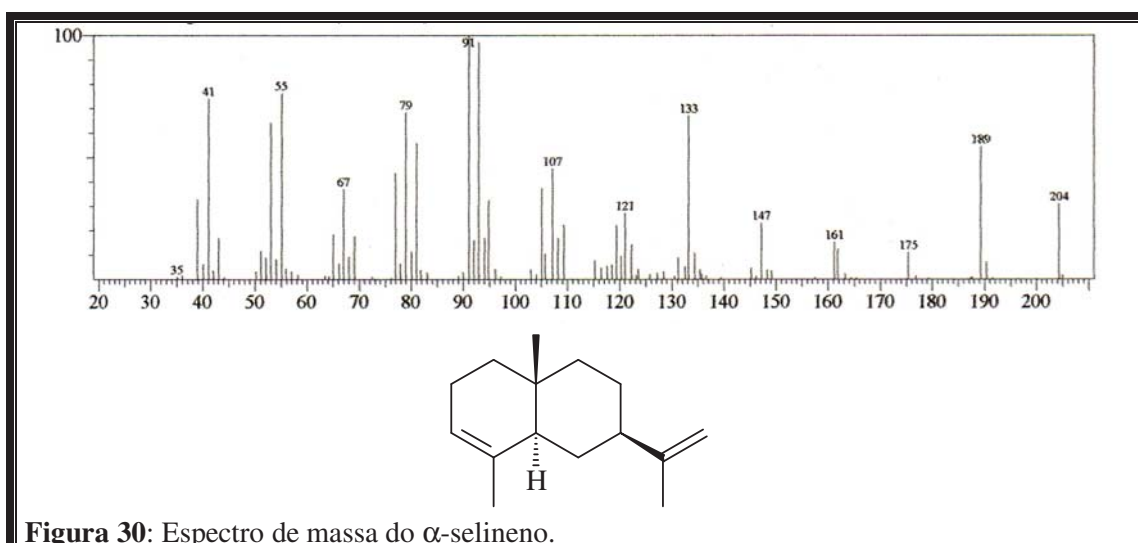
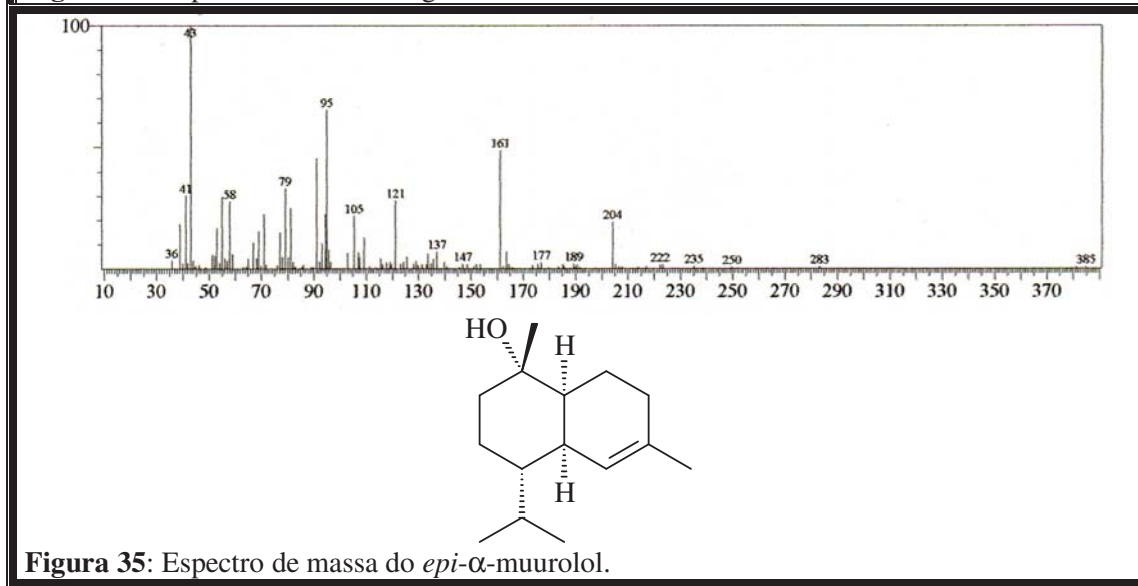
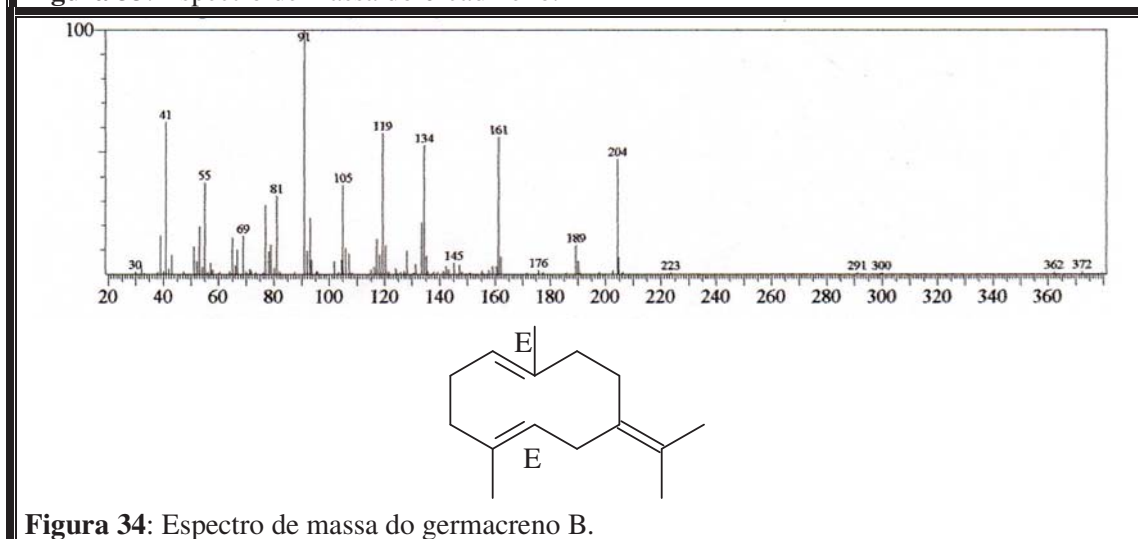
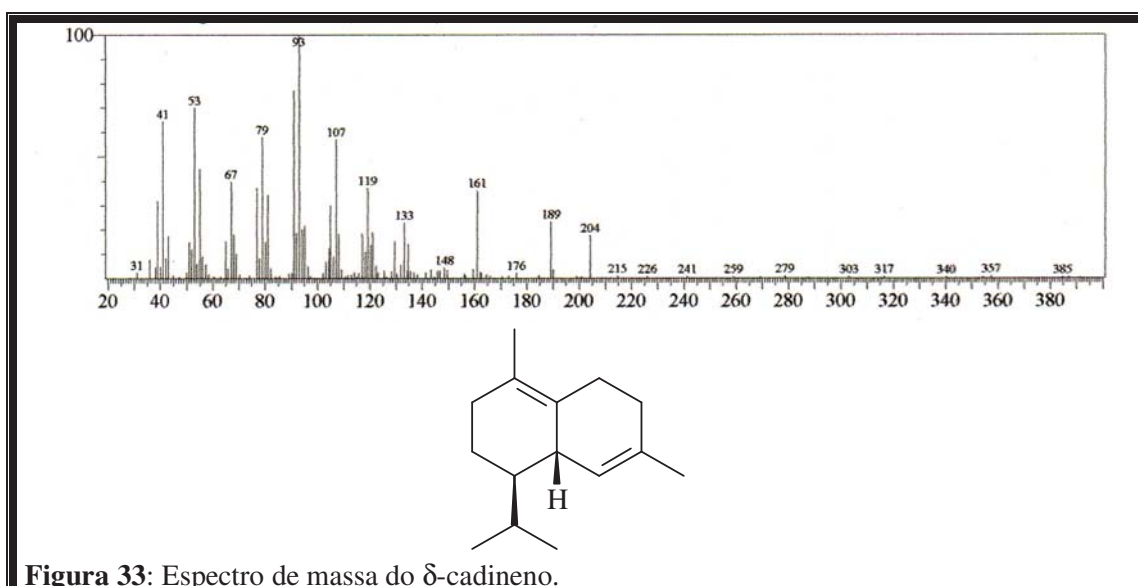


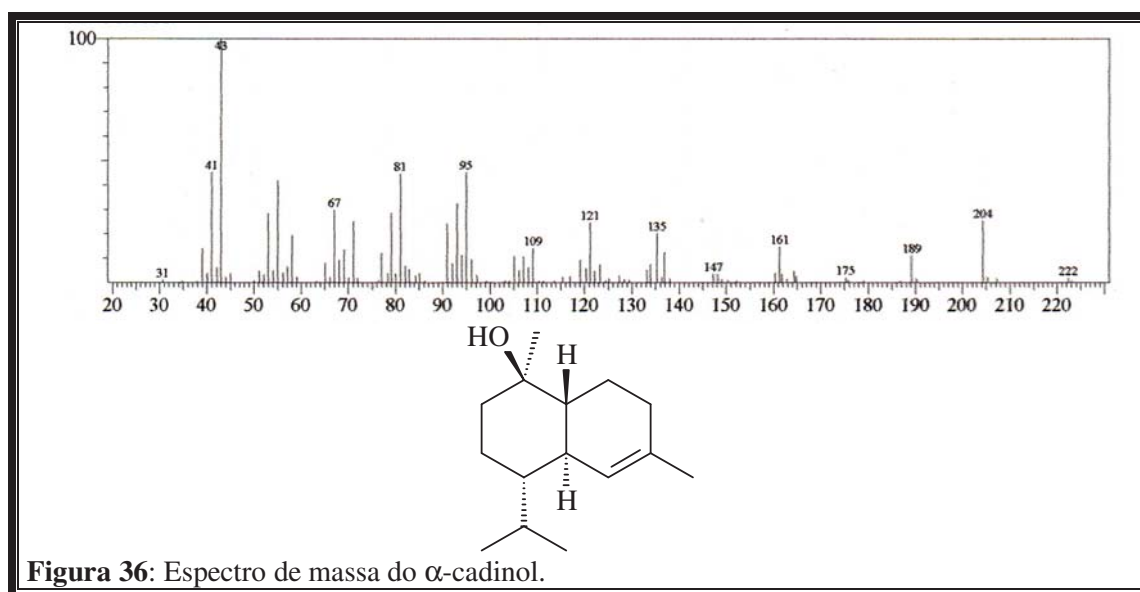
Figura 26: Espectro de massa do  $\beta$ -chamigreno.











## 4.2 Isolamento e identificação de metabólitos secundários da fração metanólica do decocto de *Cissus verticillata*

Motivados pelo uso do chá das partes aéreas de *Cissus verticillata* na medicina popular como antiinflamatório, antiepilético, anti-hipertensivo, antitérmico, antireumático e antidiabético, em especial em alguns estados brasileiros onde a planta é conhecida como insulina ou insulina vegetal, onde é utilizada no tratamento de *diabetes mellitus* tipo 2 e pela literatura que ora valida o uso do extrato aquoso das folhas de *C. verticillata* como redutor dos níveis de glicemia aloxan-induzida em ratos diabéticos e ora afirma que o extrato hidroalcoólico da planta, aumenta o grau de intolerância à glicose promovida pela dexametasona, iniciou-se a preparação de decoctos das folhas de *Cissus verticillata* (Silva, 1995; Beltrame *et al*, 2001; Barbosa *et al* 2002; Viana *et al.*, 2004).

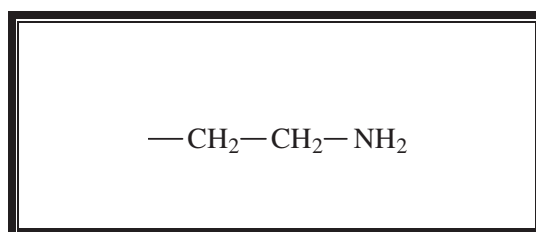
Se por um lado existiam dificuldades para a liofilização do decocto e também o fato de trabalhar com substâncias muito polares, pelo outro a literatura já relatava que os melhores resultados para a ação hipoglicemiante da planta foram obtidos à partir de extratos aquosos e solventes mais polares (Beltrame *et al*, 2001, Barbosa *et al*, 2002).

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração metanólica (CVFDSM) proveniente do decocto de *Cissus verticillata* permitiram a obtenção da fração CVFDSM-F<sub>19-24</sub>F<sub>6-8</sub> (752 mg) que foi dissolvida em 8 mL de MeOH e acrescentou-se lentamente 60 mL de acetato de etila, ocorrendo a formação de um precipitado branco, que por filtração foi separado do líquido mãe. O precipitado foi dissolvido em 5 mL de MeOH e novamente acrescentou-se lentamente 35 mL de acetato de etila, ocorrendo a formação de um novo precipitado branco (34 mg) com ponto de fusão entre 125 e 130° C denominado SM-1.

A determinação estrutural de SM-1 baseou-se inicialmente na observação do espectro de absorção na região do IV (Fig. 40, Pág. 53), o qual apresentou, além de outras absorções, deformação axial da ligação N-H em 3504 cm<sup>-1</sup> referente ao grupo amino. Deformação axial da ligação O-H em 3104 cm<sup>-1</sup> característica de fenol. Deformação axial de ligação C-H de compostos alifáticos em 2919 cm<sup>-1</sup>. Deformação axial da ligação C=C de aromático em 1595, 1496 e 1462 cm<sup>-1</sup>. Deformação axial da ligação C-O de fenol em 1223 cm<sup>-1</sup>. Deformação angular fora do plano em 833 cm<sup>-1</sup> de ligação C-H de aromático *para*-substituído.

O espectro de massa (Fig. 41, Pág. 54) de SM-1 apresentou o pico íon molecular ( $M^+$ ) com razão massa/carga igual a 137 daltons. Esta razão massa/carga ímpar permite confirmar a presença de nitrogênio na molécula em um número ímpar.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de SM-1 (Fig. 43, Pág. 55) mostrou dois dubletos centrados em  $\delta$  7,10 (2H, d,  $J = 8,4$  Hz) e  $\delta$  6,77 (2H, d,  $J = 8,4$  Hz) característicos de hidrogênios aromáticos com acoplamento *orto*. Foram observados ainda dois tripletos em  $\delta$  3,12 (2H, t,  $J = 7,7$  Hz) e  $\delta$  2,87 (2H, t,  $J = 7,7$  Hz), atribuídos a hidrogênios metilênicos acoplados. Pela observação do deslocamento químico, concluiu-se que o primeiro se encontrava ligado ao grupo amino e o segundo ligado diretamente ao anel aromático. Concluiu-se assim a existência na molécula do grupamento 2-aminoetila, como mostra a Figura abaixo (Fig. 37).

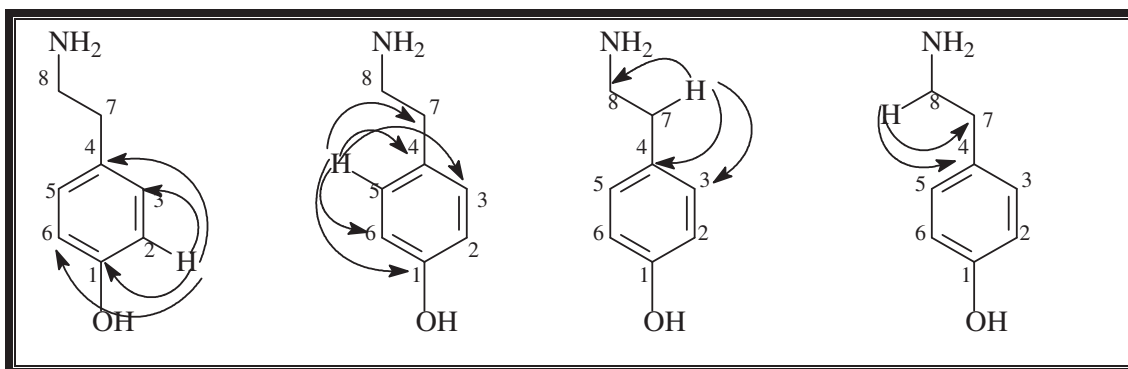


**Figura 37** – Grupo 2-aminoetila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 45, Pág. 56) apresentou 6 linhas espectrais, sendo quatro referentes a carbonos aromáticos, com deslocamentos entre  $\delta$  157,8 e 116,9. Destes, o mais desprotegido refere-se a um carbono  $\text{sp}^2$  oxigenado. Os outros dois sinais ( $\delta$  42,4 e  $\delta$  33,9) referem-se a carbonos alifáticos. A comparação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de SM-1 (Fig. 47, Pág. 57) permitiu assinalar os carbonos alifáticos como sendo metilênicos. Além disso, o espectro RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 de SM-1 revelou que os sinais em  $\delta$  130,9 e 116,9 referem-se a carbonos aromáticos hidrogenados.

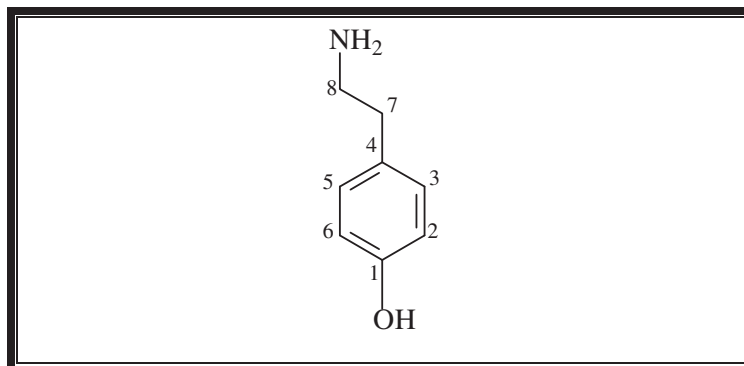
O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HMQC) (Fig. 48, Pág. 58) permitiu associar inequivocamente os sinais de todos os hidrogênios a seus respectivos carbonos (Tabela 03, Pág. 52).

O espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a mais de uma ligação, com detecção no canal de hidrogênio (HMBC) (Fig. 49, Pág. 59) mostrou os acoplamentos, a mais de uma ligação, entre hidrogênios e carbonos ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) (Fig. 38, Pág. 51 e Tabela 03, Pág. 52). A partir desse espectro foi possível confirmar o padrão de substituição no anel aromático com substituintes na posição *para*. Foram observadas as correlações, a duas ligações, entre os hidrogênios em  $\delta$  6,77 (H-2 e H-6) e o carbono em  $\delta$  157,8 (C-1), confirmando a posição do grupo hidroxila em C-1; esses mesmos hidrogênios em  $\delta$  6,77 (H-2 e H-6) acoplam a três ligações com o carbono  $\delta$  128,6 (C-4) ratificando a posição do grupo 2-aminoetil neste carbono. Os acoplamentos dos hidrogênios metilênicos, pertencentes ao grupamento 2-aminoetil, em  $\delta$  2,87 (H-7) com os carbonos em  $\delta$  42,4 (C-8), 128,6 (C-4) e 130,9 (C-3 e C-5) colaboraram para a proposição da estrutura final da molécula.



**Figura 38:** Correlações heteronucleares a mais de uma ligação observadas no espectro de RMN HMBC de SM-1.

A análise dos dados espectroscópicos obtidos para SM-1 e a posterior comparação com dados registrados na literatura (Tabela 04, Pág. 53) confirmaram que SM-1 tratava-se do 4-(2-aminoetil)fenol, (Tiramina), (Fig. 39, Pág. 51).



**Figura 39:** Estrutura do 4-(2-aminoetil)fenol. Nome usual: Tiramina.

Para avaliar a pureza da fração SM-1 foi feito o espectro de massa do cloridrato de tiramina (Fig. 42, Pág. 54) que ao ser comparado com o espectro de SM-1 apresenta os mesmos picos de razão massa/carga e os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ -BB da mistura de SM-1 e cloridrato de tiramina, não havendo nenhuma alteração perceptível na comparação entre os referidos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 50, Pág. 60) e RMN  $^{13}\text{C}$  (Fig. 51, Pág. 60) da mistura com os equivalentes espectros de SM-1.

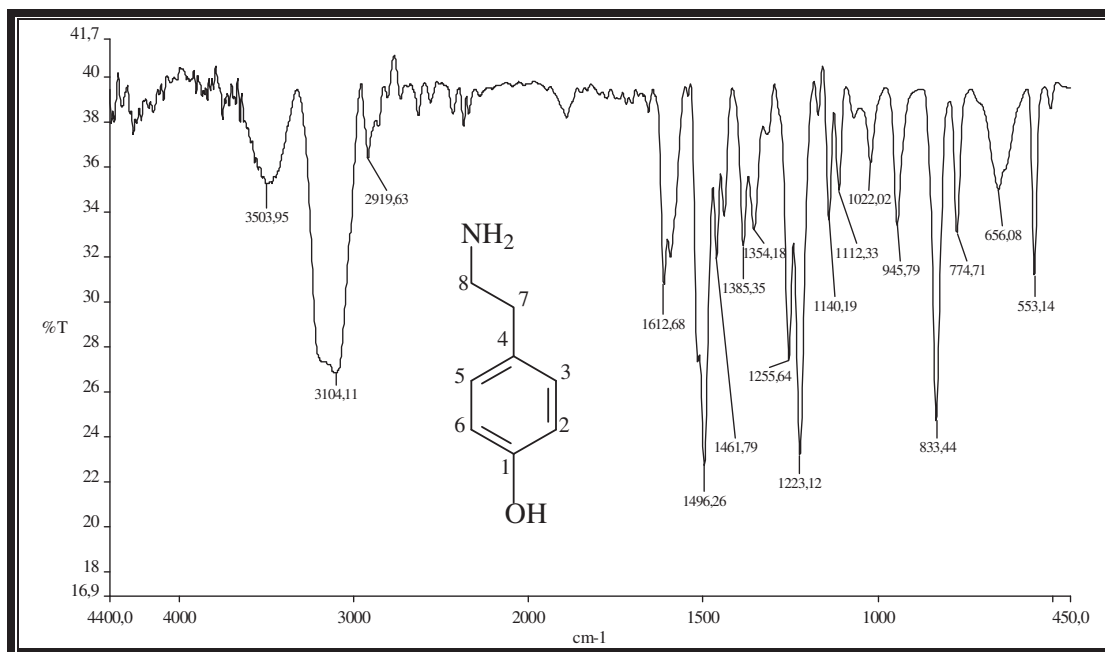
Foram realizados os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de SM-1, mostrados nas Figs. 43 e 45, Págs. 55 e 56 e ainda os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) e RMN  $^{13}\text{C}$ -BB (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) de SM-1, mostrados nas Figs. 44 e 46, Págs. 55 e 56, para comparar com os deslocamentos observados na literatura para os referidos espectros da tiramina (cloridrato de tiramina). (Pouchert e Behnke, 1993).

**Tabela 03:** Correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC) de SM-1.

| $^{13}\text{C}$ -BB |                     | HMQC                | HMBC              |                   |
|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| # C                 | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ | $^2J_{\text{CH}}$ | $^3J_{\text{CH}}$ |
| 1                   | 157,8               | —                   | 6,77              | 7,10              |
| 2, 6                | 116,9               | 6,77 (2H, d)        | —                 | 6,77              |
| 3,5                 | 130,9               | 7,10 (2H, d)        | —                 | 2,87; 7,10        |
| 4                   | 128,6               | —                   | 2,87              | 6,77              |
| 7                   | 33,9                | 2,87 (2H, t)        | 3,12              | 7,10              |
| 8                   | 42,4                | 3,12 (2H, t)        | 2,87              | —                 |

**Tabela 04:** Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de SM-1 (125 MHz) com os descritos na literatura para o cloridrato de tiramina (15 MHz, DMSO-*d*6) (Pouchert e Behnke 1993).

| # C  | SM-1<br>$\delta\text{C}$ (CD <sub>3</sub> OD) | SM-1<br>$\delta\text{C}$ (DMSO- <i>d</i> 6) | Tiramina<br>$\delta\text{C}$ (DMSO- <i>d</i> 6) |
|------|---|---|---|
| 1    | 157,8   | 156,2                                       | 155,6   |
| 2, 6 | 116,9   | 115,4                                       | 115,0   |
| 3,5  | 130,9   | 129,5                                       | 129,3   |
| 4    | 128,6   | 127,3                                       | 129,9   |
| 7    | 33,9  | 32,2  | 38,7  |
| 8    | 42,4  | 40,3  | 43,7  |



**Figura 40:** Espectro de IV de SM-1 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).

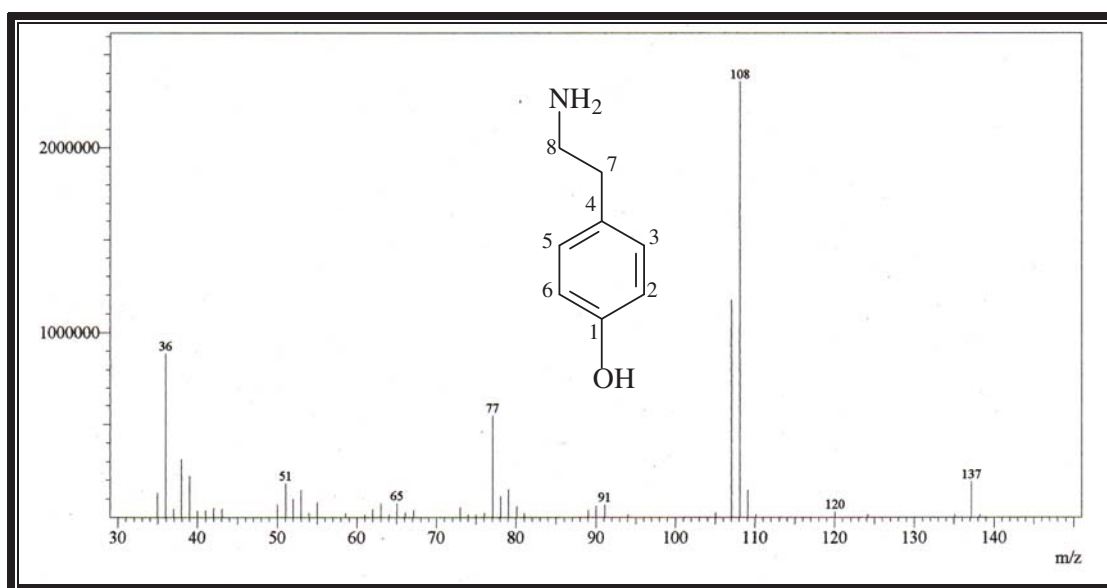


Figura 41: Espectro de massa de SM-1 (impacto eletrônico a 70 eV).

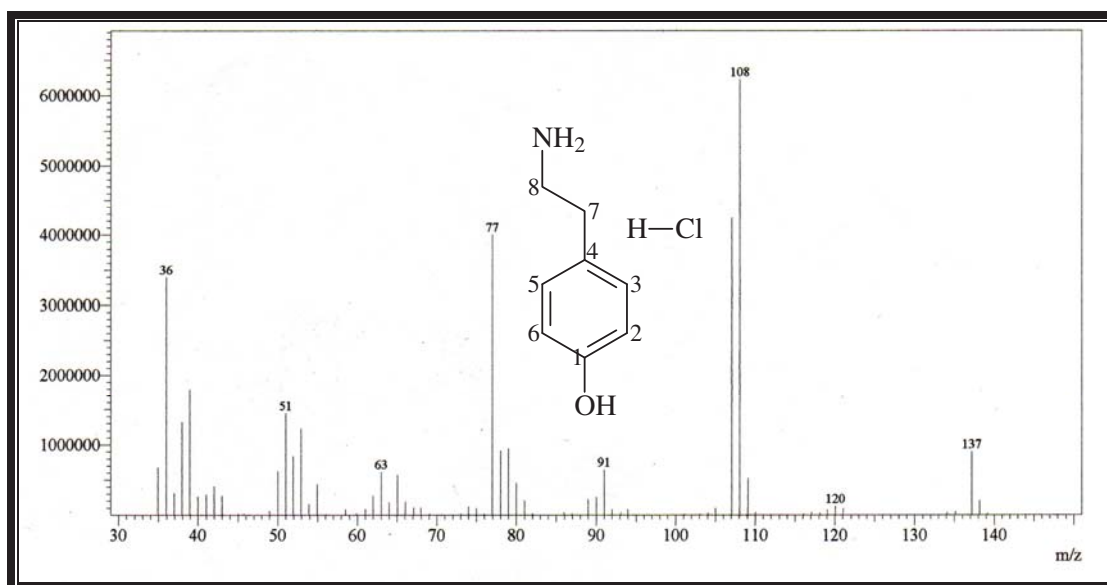


Figura 42: Espectro de massa do Cloridrato de tiramina (impacto eletrônico a 70 eV).



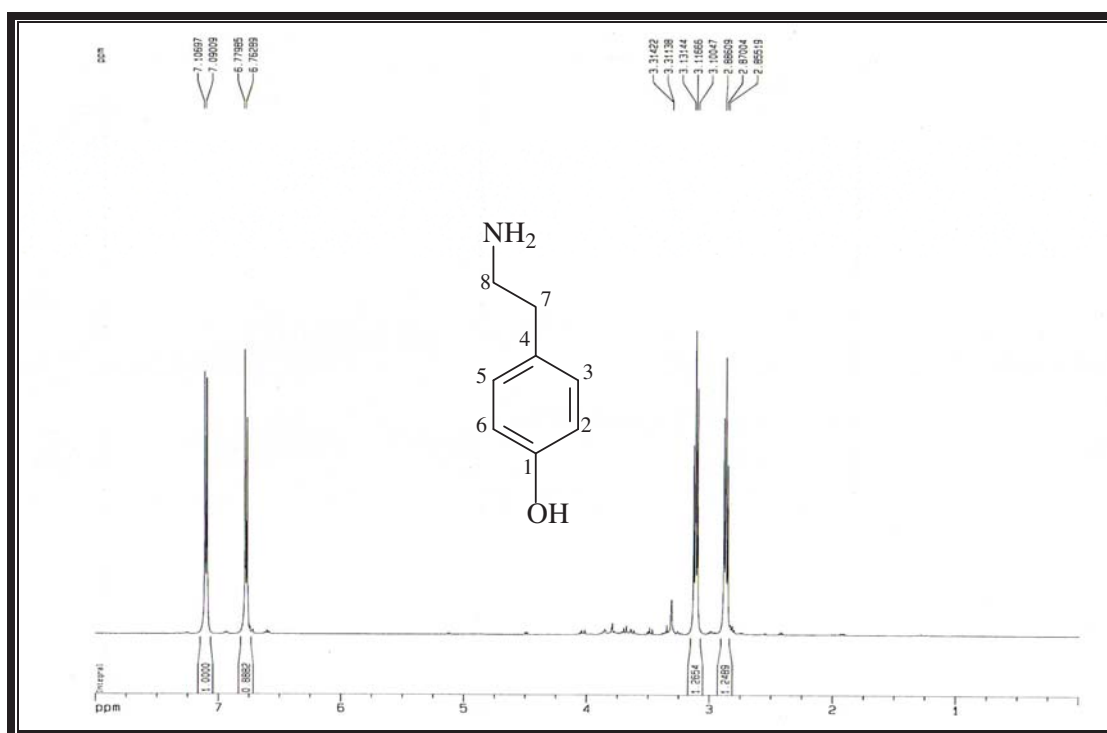


Figura 43: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) de SM-1.



Figura 44: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz) de SM-1.

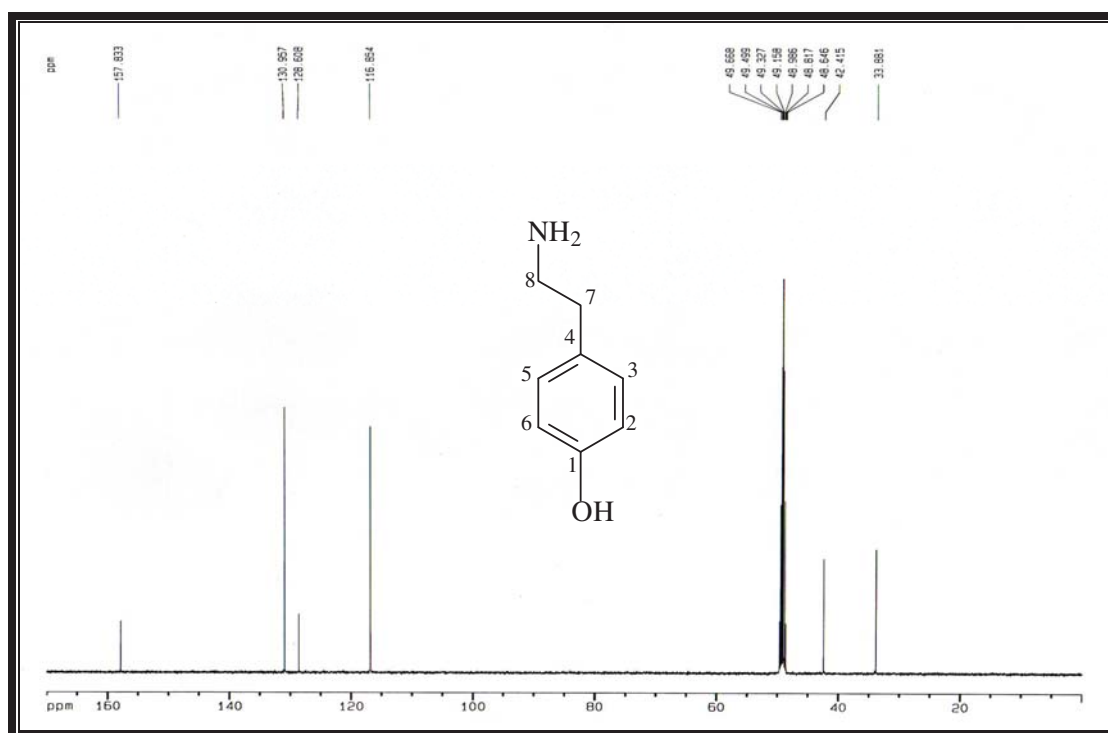


Figura 45: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de SM-1.

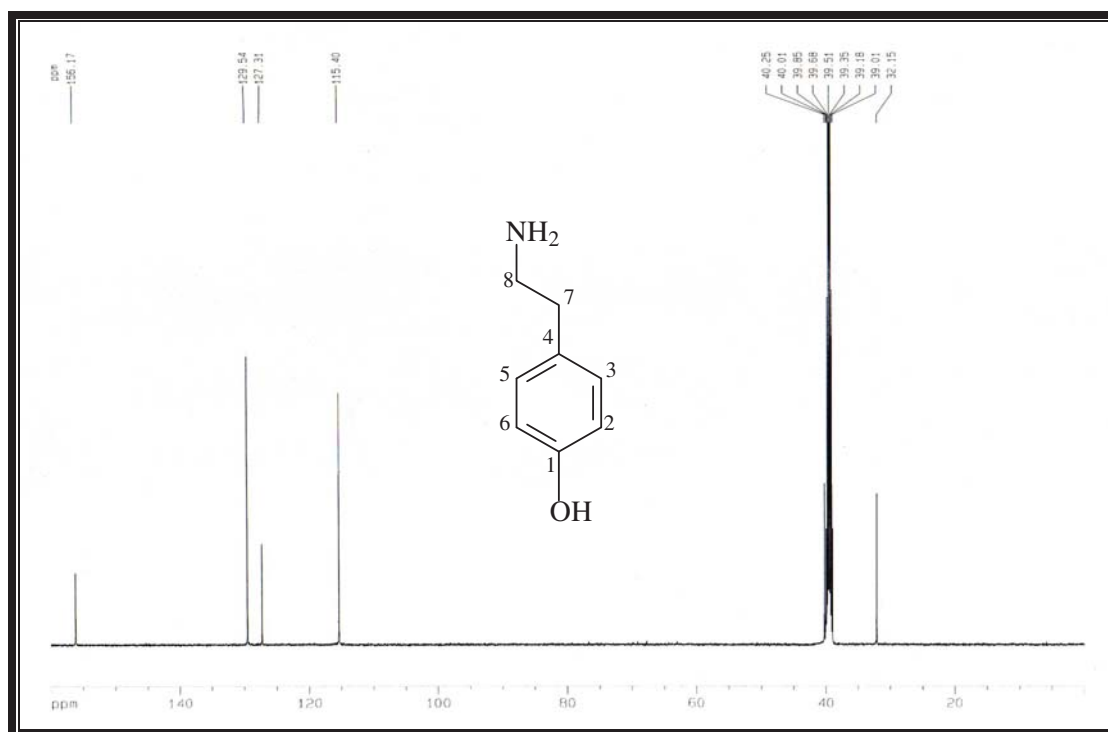


Figura 46: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ , 125 MHz) de SM-1.

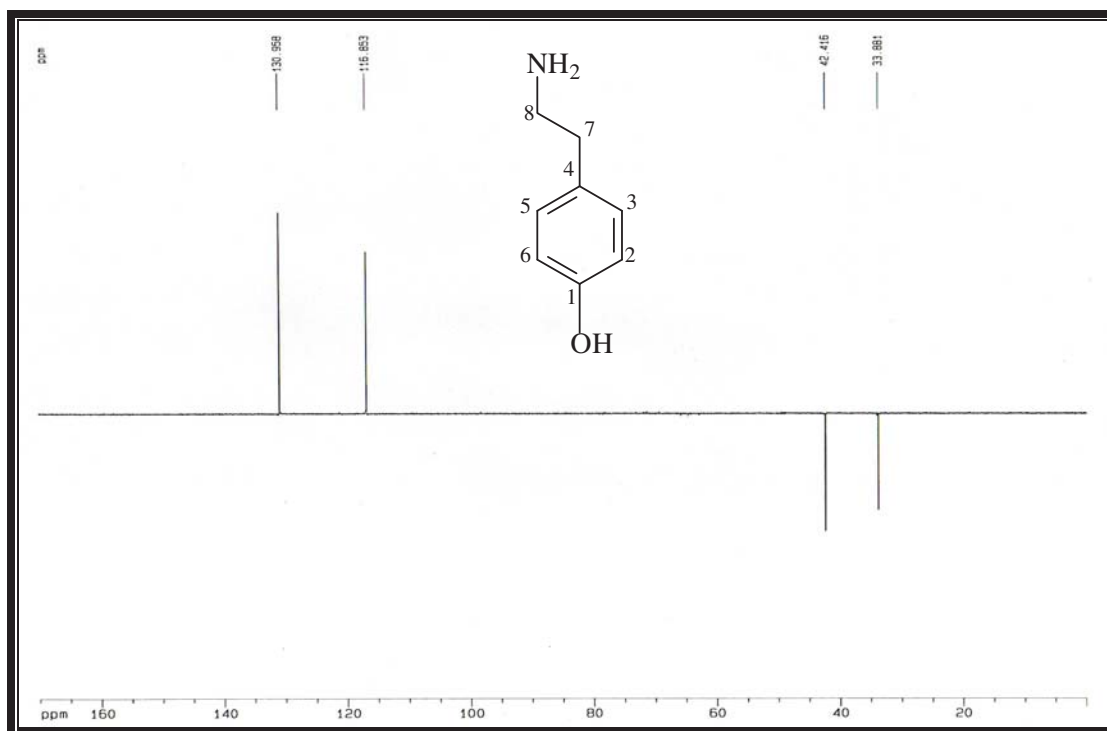
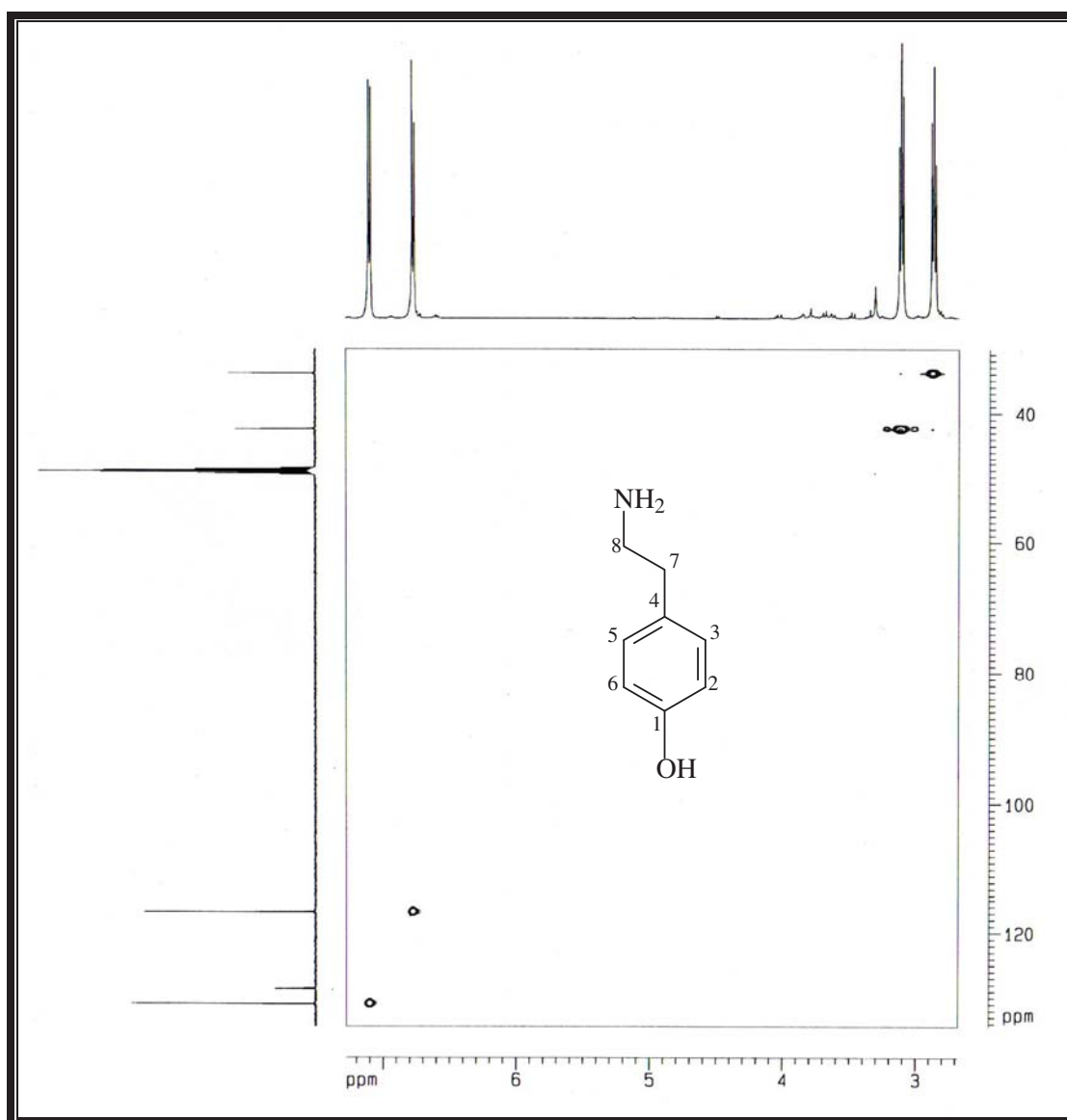


Figura 47: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) de SM-1.



**Figura 48:** Espectro de RMN HMQC (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) de SM-1.

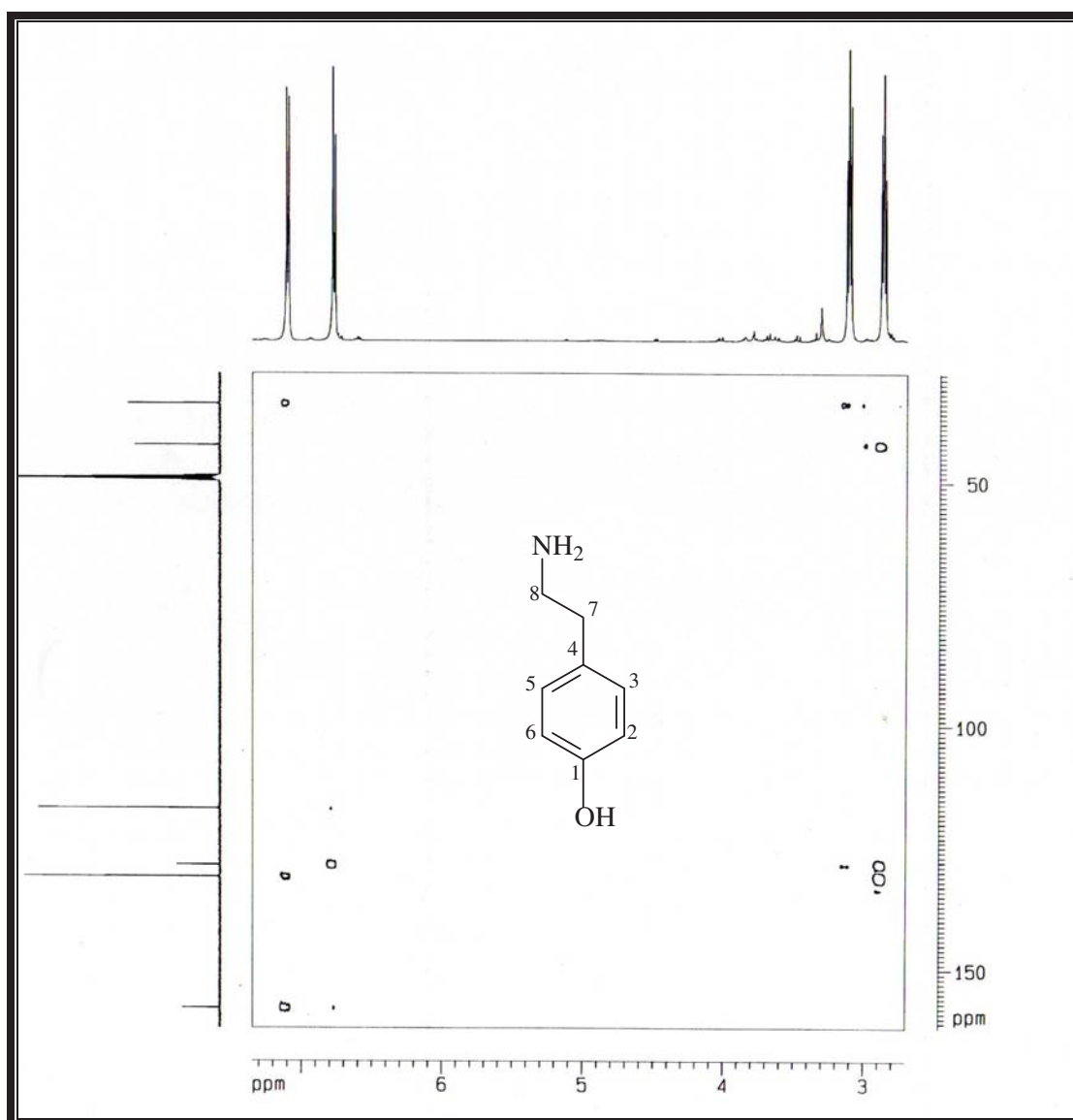
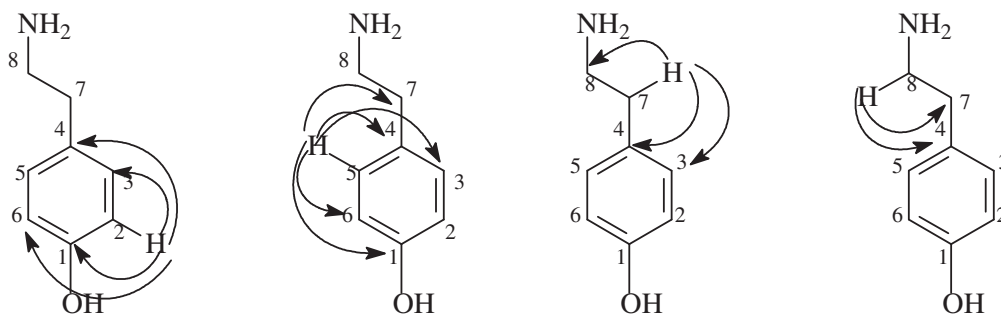


Figura 49: Espectro de RMN HMBC (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) de SM-1.



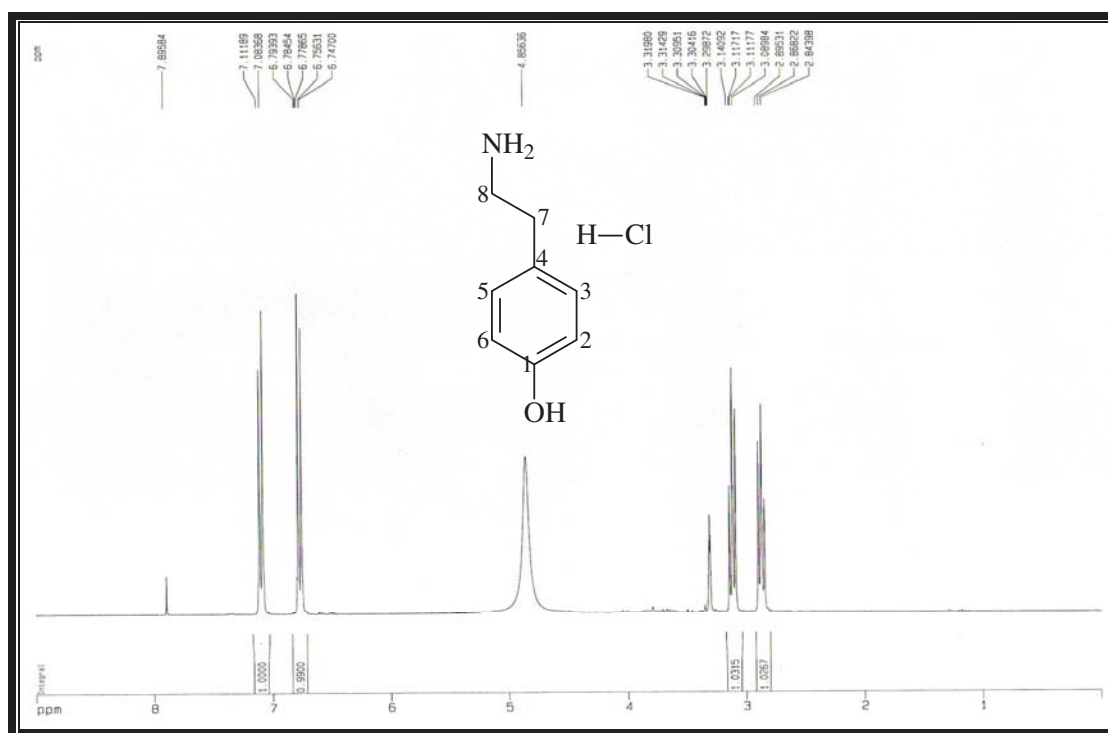


Figura 50: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura: SM-1 e Cloridrato de tiramina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

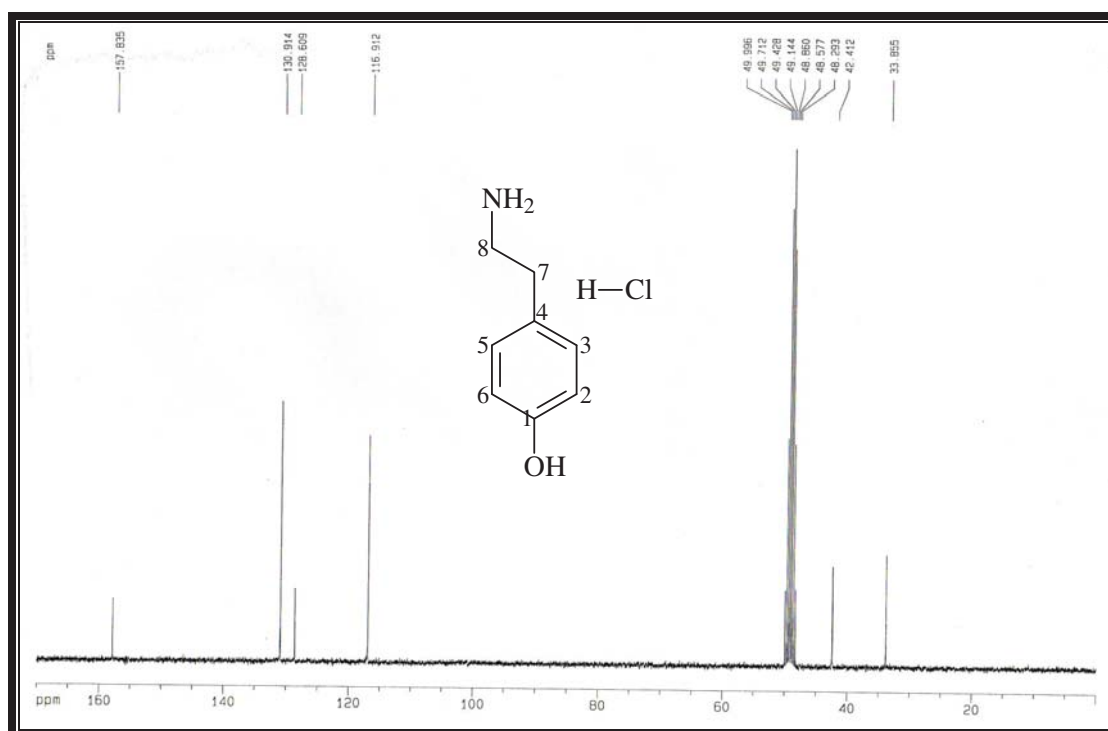


Figura 51: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da mistura: SM-1 e Cloridrato de tiramina ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).

São mostrados a seguir os espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da fração rica em tiramina (CVFDSM-F<sub>19-24</sub>), obtida do primeiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM (Fig. 52, Pág. 61) e utilizada como padrão para os demais fracionamentos. Para a realização dos testes farmacológicos, outras frações ricas em tiramina foram obtidas no segundo e no terceiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM e os seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) são mostrados nas Figs. 53 e 54, Pág. 62. Frações semelhantes, ricas em tiramina, foram obtidas sucessivas vezes para a realização dos testes farmacológicos.

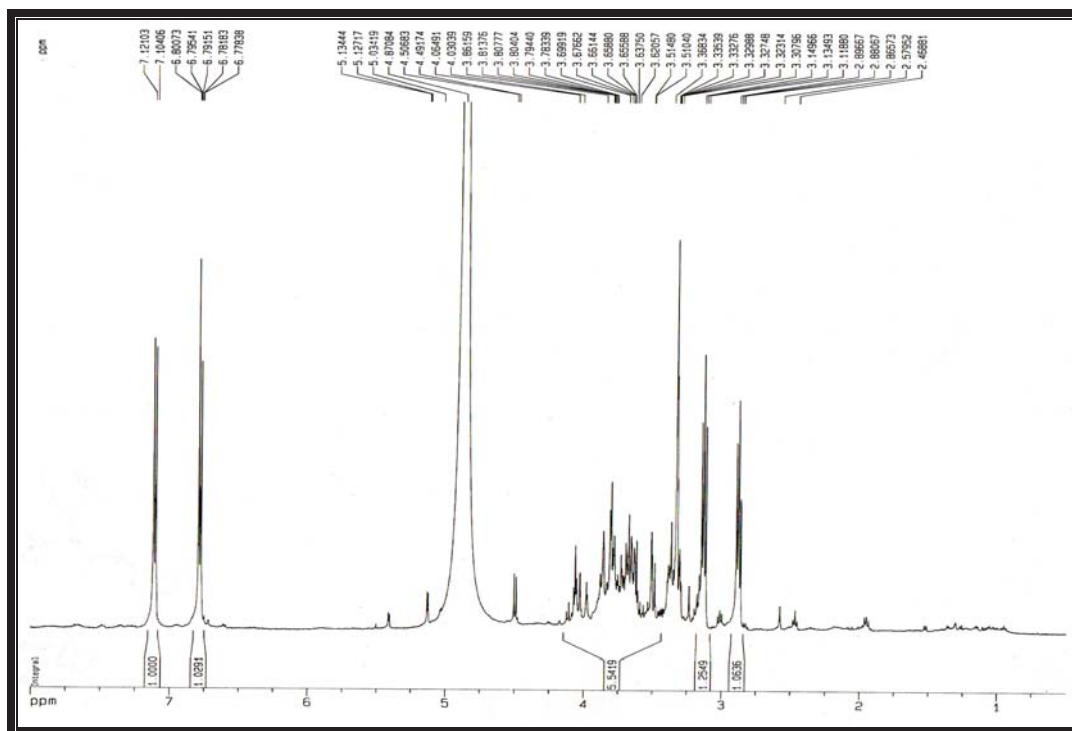
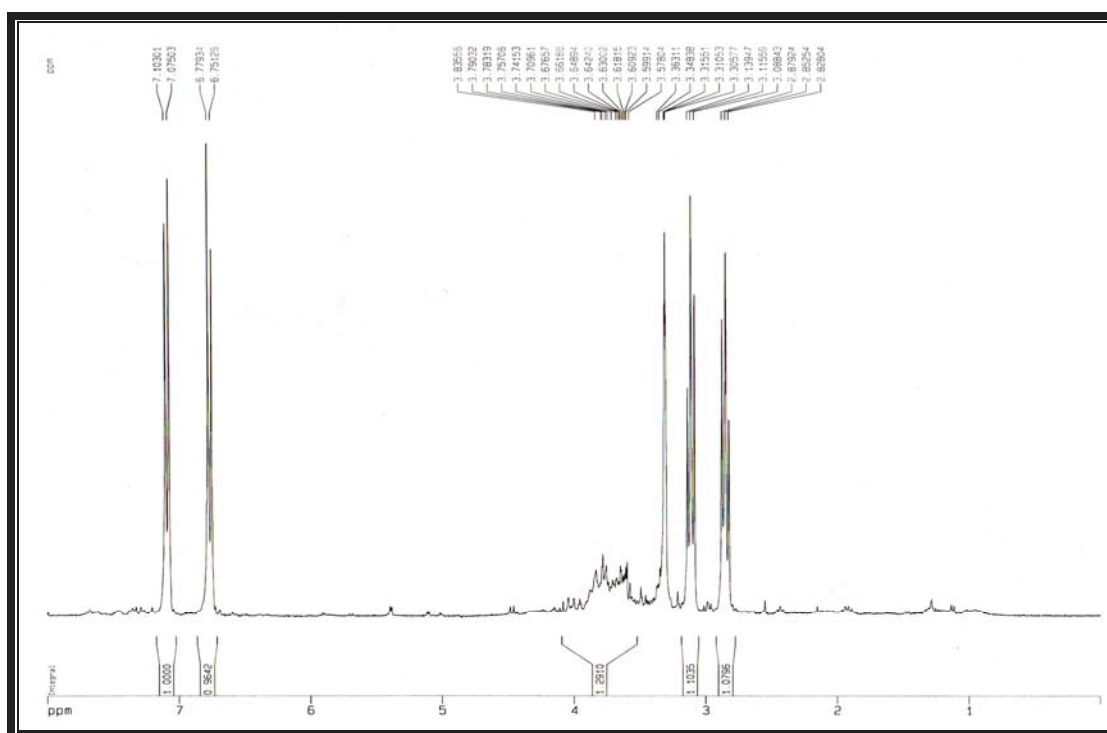
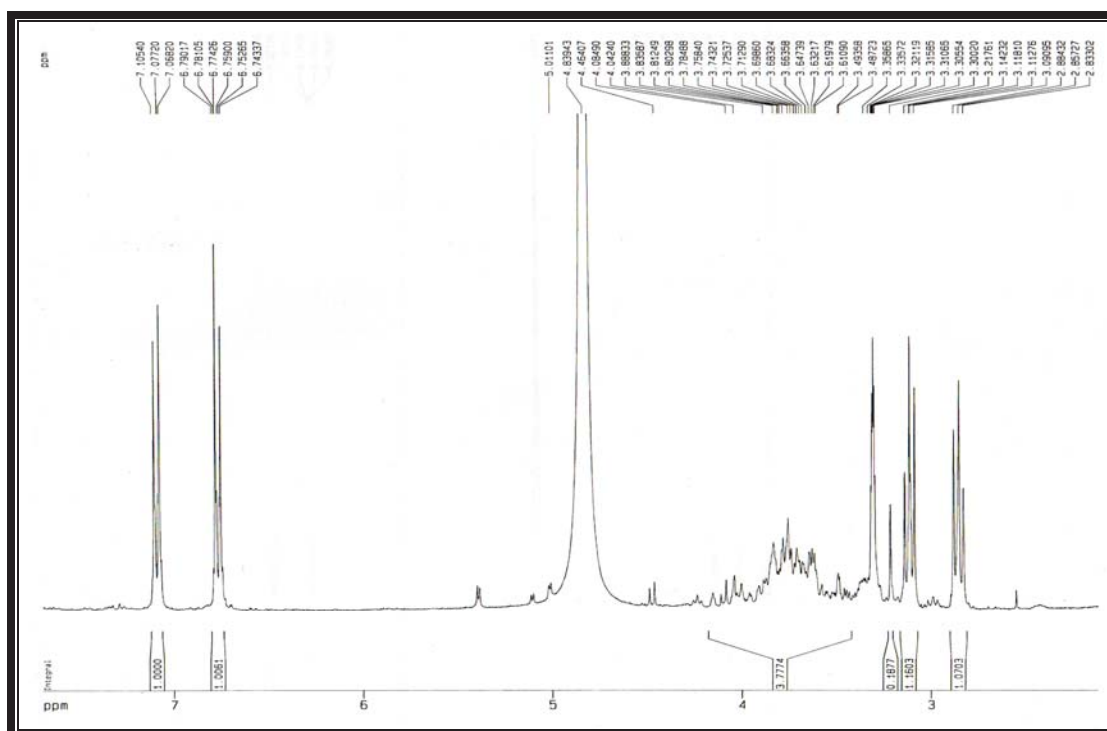


Figura 52: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da fração (CVFDSM-F<sub>19-24</sub>).



**Figura 53:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da fração ( $\text{E}_2$ )CVFDSM-F $_{13-20}$ ) obtida no segundo fracionamento cromatográfico de CVFDSM.



**Figura 54:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) da fração ( $\text{E}_3$ )CVFDSM-F $_{11-19}$ ) obtida no terceiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM.



### 4.3 Isolamento e identificação de metabólitos secundários da fração hexânica do extrato etanólico de *Cissus verticillata*

#### 4.3.1 Isolamento e identificação de EH-1

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica (CVFEET-FH), proveniente da partição do extrato etanólico das folhas secas de *Cissus verticillata* resultou na fração CVFEET-FH-F<sub>70-80</sub> (16,00 mg) de um sólido branco, amorfo, solúvel em piridina, com ponto de fusão na faixa de 289-292 °C que foi denominado EH-1.

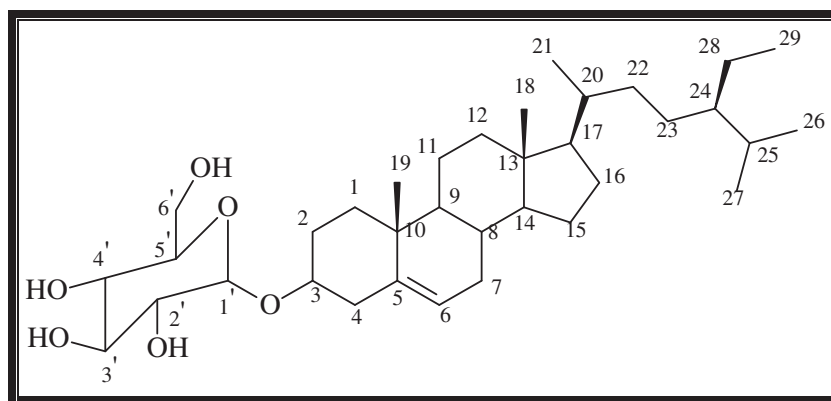
O espectro de RMN <sup>13</sup>C-BB (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 75 MHz) de EH-1 (Fig. 56, Pág. 66), apresentou 35 linhas espectrais, sendo duas delas atribuídas a carbonos olefínicos ( $\delta$  141,5 e 122,4), como se pode presumir pelo valor do deslocamento químico. Sete sinais com deslocamentos entre  $\delta$  103,1 e 63,4 são relativos aos carbonos oxigenados, seis deles relativos a uma unidade glicosídica. Dentre os carbonos da unidade glicosídica, observa-se um carbono mais desprotegido, o carbono anomérico. Os demais sinais entre  $\delta$  55,4 e 12,5 são característicos de carbonos saturados. O número de sinais observados neste espectro e os deslocamentos químicos dos mesmos são compatíveis com os do esqueleto de um esteróide na forma de heterosídeo.

Pela comparação do espectro anteriormente citado com o espectro de RMN <sup>13</sup>C-DEPT 135 (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 75 MHz) de EH-1 e a expansão deste mesmo espectro na região de  $\delta$  18,0 a 80,0 (Figs. 57 e 58, Págs. 66 e 67) foi possível sugerir o esqueleto proposto de 6 carbonos metílicos ( $\delta$  20,4 ; 19,9; 19,8; 19,5; 12,7; 12,5), 12 metilênicos ( $\delta$  63,4; 40,5; 39,9; 38,0; 34,8; 32,7; 30,8; 29,0; 27,0; 25,0; 23,9; 21,9), 14 metínicos ( $\delta$  122,4; 103,1; 79,1; 78,9; 78,7; 75,8; 72,3; 57,4; 56,8; 50,9; 46,6; 36,9; 32,6; 30,1) e 3 carbonos não-hidrogenados ( $\delta$ 141,5; 43,0; 37,5).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, 300 MHz) de EH-1 (Fig. 59, Pág. 67) mostrou um sinal largo em  $\delta$  5,38 (1 H) referente a hidrogênio olefínico. Mostrou ainda um dubleto em  $\delta$  5,07 (d,  $J = 6,7$  Hz) e multipletos centrados em  $\delta$  4,58; 4,43; 4,31 e 4,08 referentes a hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, colaborando para a proposição da presença da glicose na estrutura do esteróide. Por fim foram observados multipletos entre  $\delta$  2,78 e 1,24, de

hidrogênios alifáticos e sinais intensos, característicos de grupamentos metila, entre  $\delta$  1,02 a 0,69. São apresentados também os espectros expandidos de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz) de EH-1 (Figs. 60 e 61, Pág. 68).

A análise dos dados espectroscópicos obtidos para EH-1 e a posterior comparação com dados registrados na literatura (Tabela 05, Pág. 65) sugerem que EH-1 trata-se do  $\beta$ -sitosterol glicosilado, mostrado na Figura a seguir (Fig. 55).



**Figura 55:** Estrutura do  $\beta$ -sitosterol glicosilado.

**Tabela 05:** Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) com os descritos na literatura para  $\beta$ -sitosterol glicosilado, RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz). (Kursten, 1994).

| <b>C</b> | <b>EH-1</b> | <b><math>\beta</math>-sitosterol glicosilado</b> |
|----------|-------------|--|
| 1'       | 103,1       | 102,3  |
| 2'       | 78,7        | 78,2   |
| 3'       | 78,9        | 77,9   |
| 4'       | 72,3        | 71,5   |
| 5'       | 75,8        | 75,1   |
| 6'       | 63,4        | 62,6   |
| 1        | 38,0        | 37,3   |
| 2        | 30,8        | 31,9   |
| 3        | 79,1        | 78,3   |
| 4        | 39,9        | 39,8   |
| 5        | 141,5       | 140,7  |
| 6        | 122,4       | 121,6  |
| 7        | 32,7        | 30,0   |
| 8        | 32,6        | 32,0   |
| 9        | 50,9        | 50,1   |
| 10       | 37,5        | 36,7   |
| 11       | 21,8        | 21,1   |
| 12       | 40,5        | 39,1   |
| 13       | 43,0        | 42,3   |
| 14       | 57,4        | 56,1   |
| 15       | 25,0        | 24,3   |
| 16       | 29,0        | 28,3   |
| 17       | 56,8        | 56,6   |
| 18       | 12,7        | 11,8   |
| 19       | 19,8        | 19,0   |
| 20       | 36,9        | 36,2   |
| 21       | 19,5        | 19,2   |
| 22       | 34,8        | 34,0   |
| 23       | 27,0        | 26,2   |
| 24       | 46,6        | 45,8   |
| 25       | 30,1        | 29,3   |
| 26       | 20,4        | 18,8   |
| 27       | 19,9        | 19,7   |
| 28       | 23,9        | 23,5   |
| 29       | 12,5        | 11,9   |

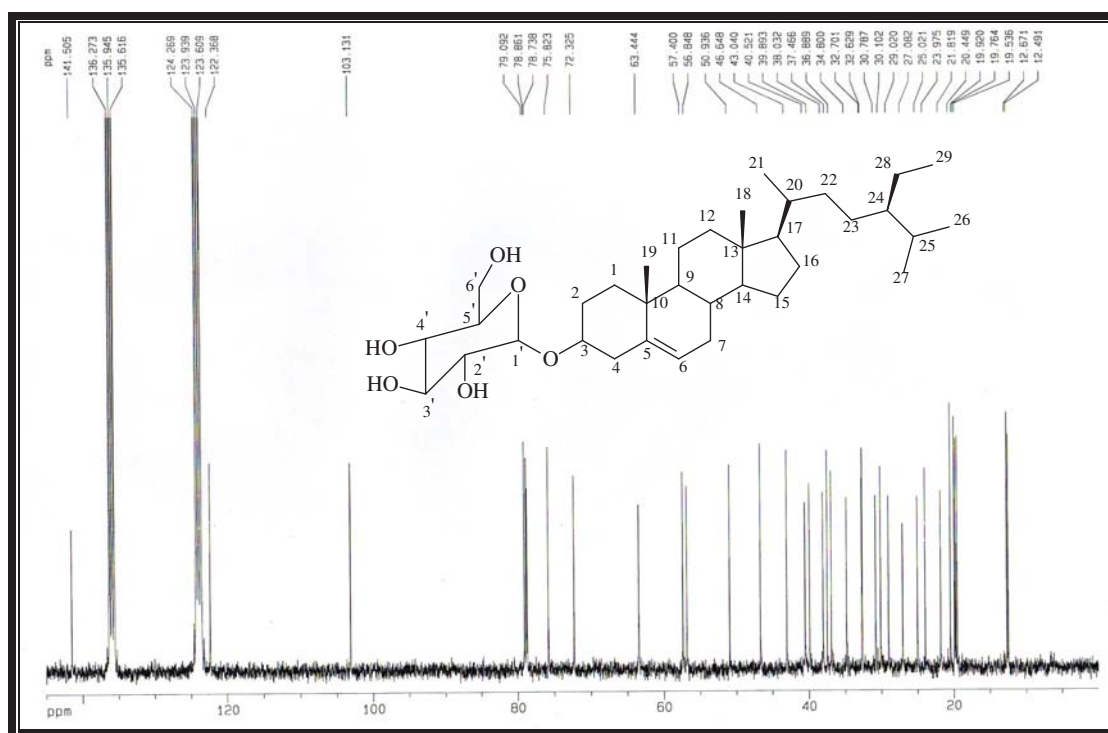


Figura 56: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) de EH-1.

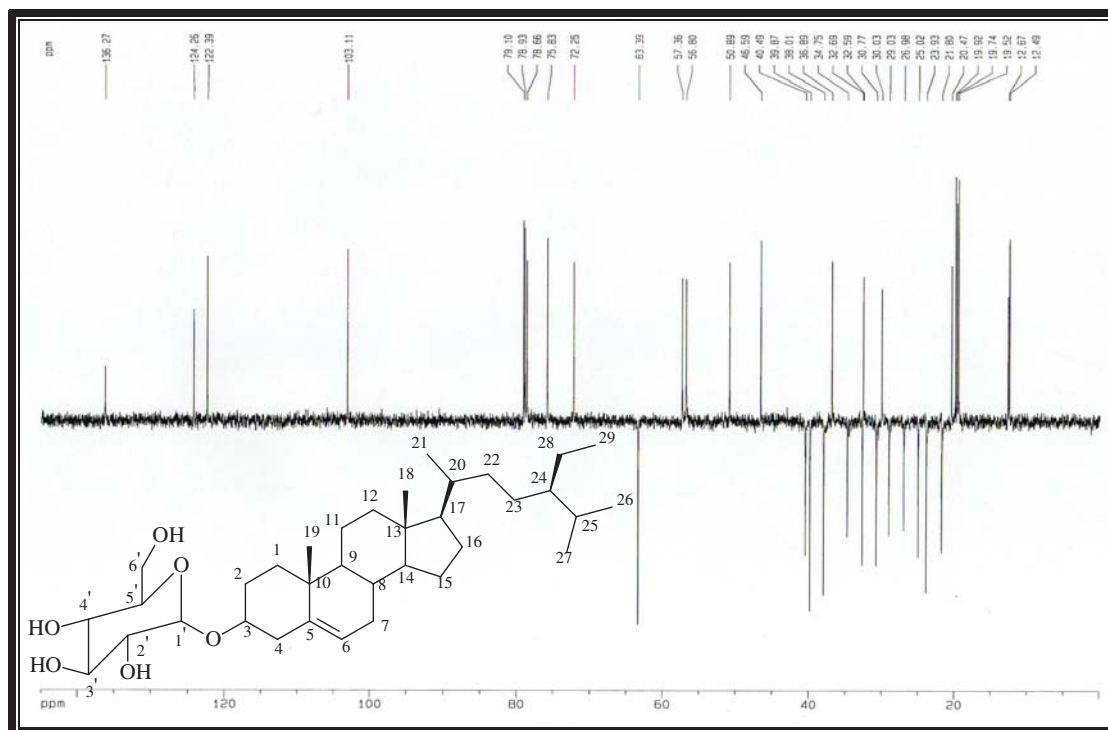


Figura 57: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) de EH-1.

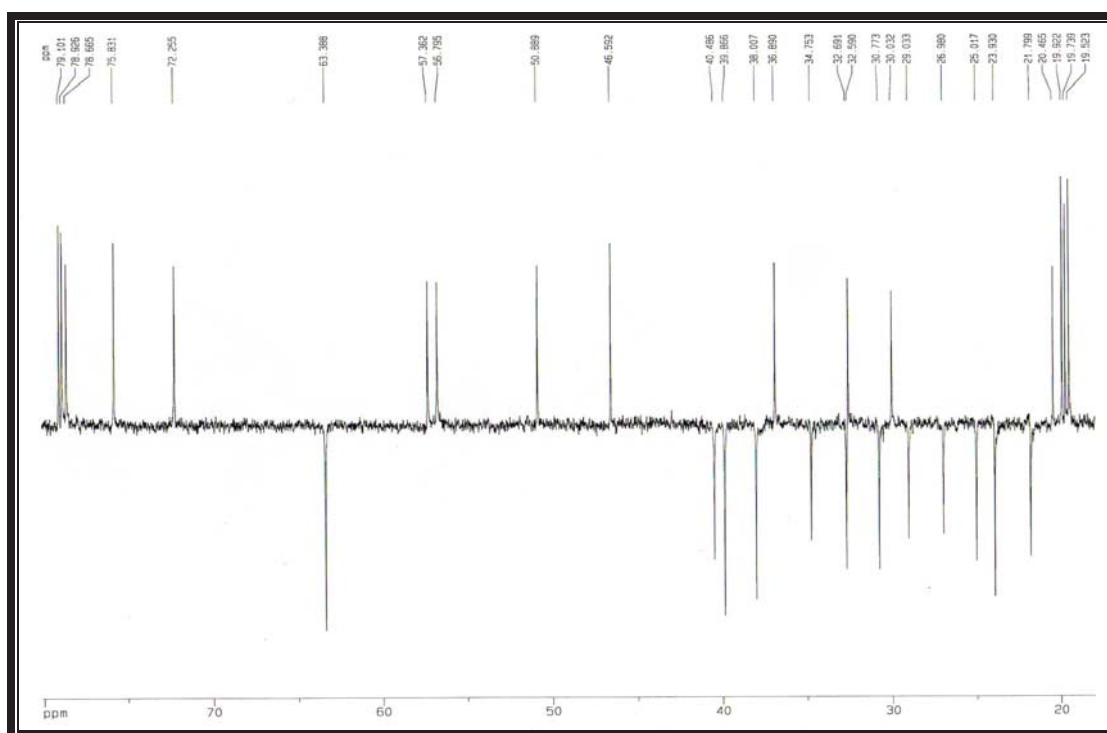


Figura 58: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) de EH-1. Expansão da região  $\delta$  18,0 a 80,0.

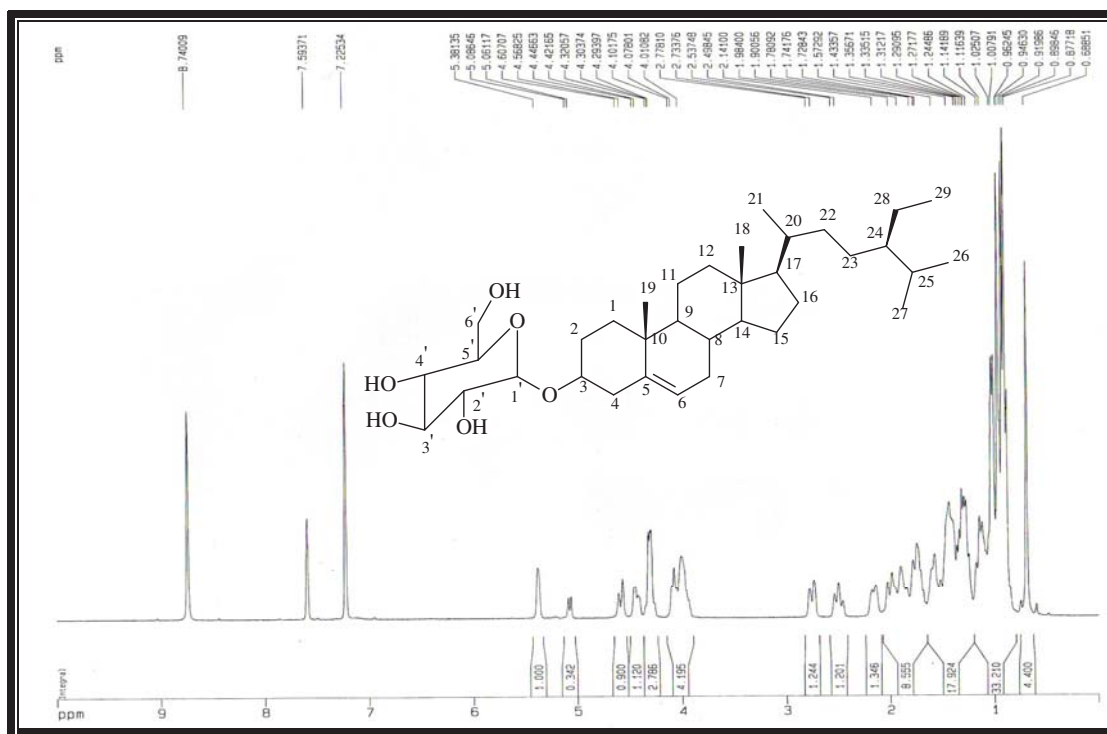


Figura 59: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz) de EH-1.

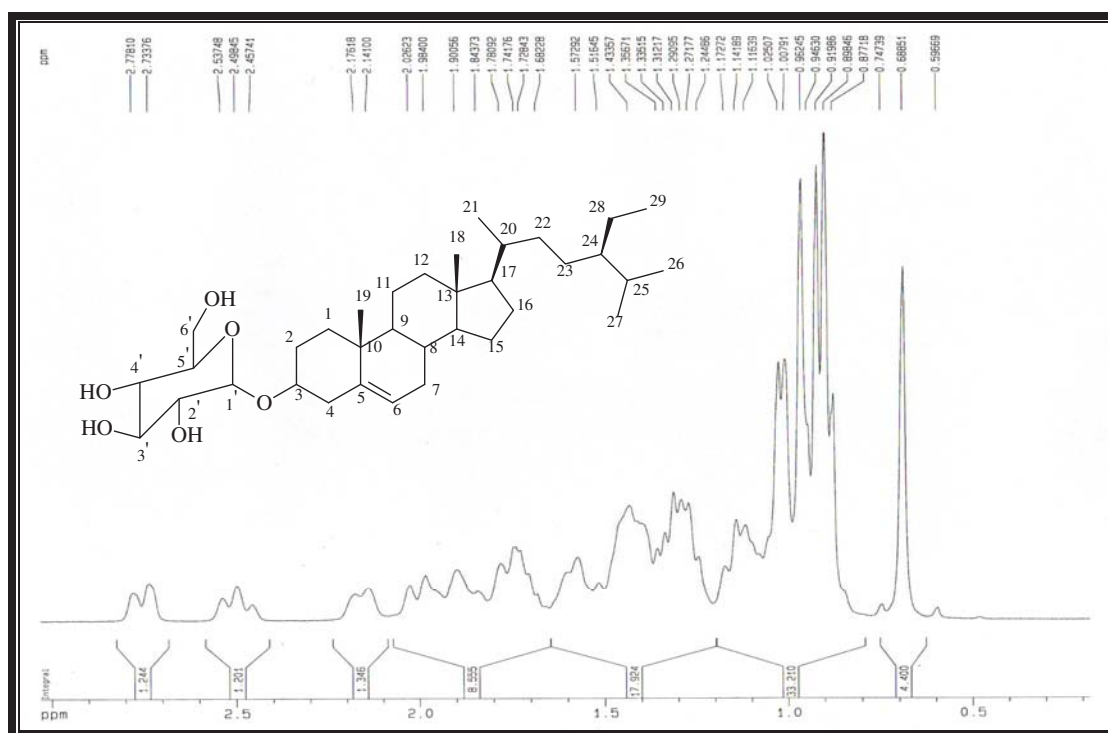


Figura 60: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz) de EH-1. Expansão da região  $\delta$  0,5 a 3,0.

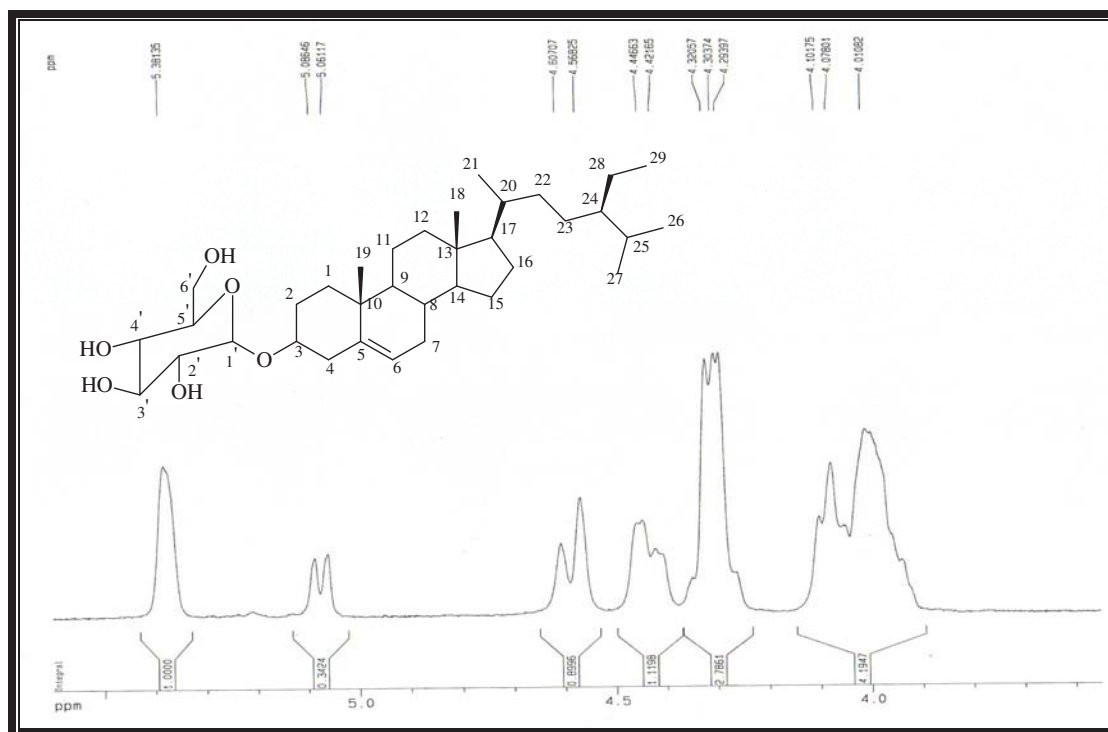


Figura 61: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz) de EH-1. Expansão da região  $\delta$  3,0 a 6,0.

### 4.3.2 Isolamento e identificação de EH-2

O fracionamento cromatográfico da fração hexânica (CVFEET-FH), resultou entre outras frações, 0,1803g da fração CVFEET-FH-F<sub>30-35</sub>, que após novo tratamento cromatográfico originou 19,9 mg da fração CVFEET-FH-F<sub>30-35</sub>-F<sub>25-27</sub>. Esta fração após processo de recristalização, resultou em 13,4 mg de um sólido branco, na forma de cristais aciculares, denominado de EH-2.

O espectro de absorção na região do IV de EH-2 (Fig. 63, Pág. 72), exibiu bandas compatíveis com estiramentos de grupos hidroxila ( $\nu_{\text{OH}}$  3433  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramentos de grupos de natureza alifática ( $\nu_{\text{CH}}$  2935  $\text{cm}^{-1}$ ) e olefínica ( $\nu_{\text{C=C}}$  1653  $\text{cm}^{-1}$ ), deformação angular de grupos metilênicos ( $\nu_{\text{CH}}$  1458  $\text{cm}^{-1}$ ) e metílicos ( $\nu_{\text{CH}}$  1372  $\text{cm}^{-1}$ ) e ainda a deformação axial da ligação C-O de álcoois ( $\nu_{\text{CO}}$  1057  $\text{cm}^{-1}$ ).

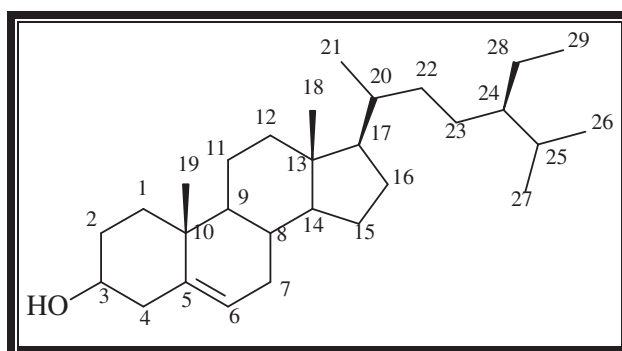
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB de EH-2 (Fig. 64, Pág. 72), revelou a presença de 28 linhas espectrais, sendo duas delas atribuídas a carbonos olefínicos ( $\delta$  141,0 e 121,9), uma em  $\delta$  72,0 de carbono  $\text{sp}^3$  oxigenado e as demais referentes a carbonos alifáticos compatíveis com esqueletos derivados do encadeamento do isopreno (esqueletos terpenoídicos e esteroidais).

A comparação do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 para EH-2 (Fig. 65, Pág. 73) permitiu concluir que das 27 linhas espectrais observadas no primeiro, 6 correspondem a carbonos metílicos ( $\delta$  20,0; 19,6; 19,3; 19,0; 12,2; 12,1), 10 a carbonos metilênicos ( $\delta$  42,5; 40,0; 37,5; 34,2; 31,9; 28,5; 26,3; 24,5; 23,0; 21,3), 9 a carbonos metínicos ( $\delta$  121,9; 72,0; 57,0; 56,3; 50,4; 46,1; 36,4; 32,1; 29,4) e 2 a carbonos não-hidrogenados ( $\delta$  141,0; 36,7).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) (Fig. 66, Pág. 73), apresentou um dubleto em  $\delta$  5,36 (1 H, d,  $J = 5,0$  Hz) correspondente a um hidrogênio ligado a carbono olefínico, confirmando a presença da dupla ligação observada nos espectros analisados anteriormente; um multipletto em  $\delta$  3,53, correspondente a um átomo de hidrogênio ligado a carbono carbinólico; multipletos em  $\delta$  2,29; 2,01; 1,85 e 1,50, relativos à hidrogênios de carbonos metilênicos; hidrogênios de grupos metilas em  $\delta$  1,02 (s); 0,91(d,  $J = 6,45$  Hz), na faixa de

$\delta$  0,87 a 0,80 e em  $\delta$  0,69 (s). É apresentado também o espectro expandido de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de EH-2 na região de  $\delta$  0,5 a 2,5 (Fig. 67, Pág. 74).

A análise dos dados espectroscópicos obtidos para EH-2 e a posterior comparação com dados registrados na literatura (Tabela 06, Pág. 71) sugerem que EH-2 trata-se do  $\beta$ -sitosterol, apresentado na Figura a seguir (Fig. 62).



**Figura 62:** Estrutura do  $\beta$ -sitosterol.



**Tabela 06:** Comparação dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de EH-2 (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) com os descritos na literatura para  $\beta$ -sitosterol. (Macari, 1990).

| C  | EH-2  | $\beta$ -sitosterol |
|----|-------|---------------------|
| 1  | 37,5  | 37,2                |
| 2  | 31,9  | 31,6                |
| 3  | 72,0  | 71,7                |
| 4  | 42,5  | 42,3                |
| 5  | 141,0 | 140,7               |
| 6  | 121,9 | 121,6               |
| 7  | 31,9  | 31,8                |
| 8  | 32,1  | 31,8                |
| 9  | 50,4  | 50,1                |
| 10 | 36,7  | 36,4                |
| 11 | 21,3  | 21,1                |
| 12 | 40,0  | 39,7                |
| 13 | 42,5  | 42,3                |
| 14 | 57,0  | 56,7                |
| 15 | 24,5  | 24,2                |
| 16 | 28,5  | 28,1                |
| 17 | 56,3  | 56,1                |
| 18 | 12,2  | 11,9                |
| 19 | 19,6  | 19,3                |
| 20 | 36,4  | 36,0                |
| 21 | 19,0  | 18,7                |
| 22 | 34,2  | 33,9                |
| 23 | 26,3  | 26,1                |
| 24 | 46,1  | 45,8                |
| 25 | 29,4  | 29,1                |
| 26 | 20,0  | 19,6                |
| 27 | 19,3  | 18,9                |
| 28 | 23,0  | 23,0                |
| 29 | 12,1  | 11,9                |

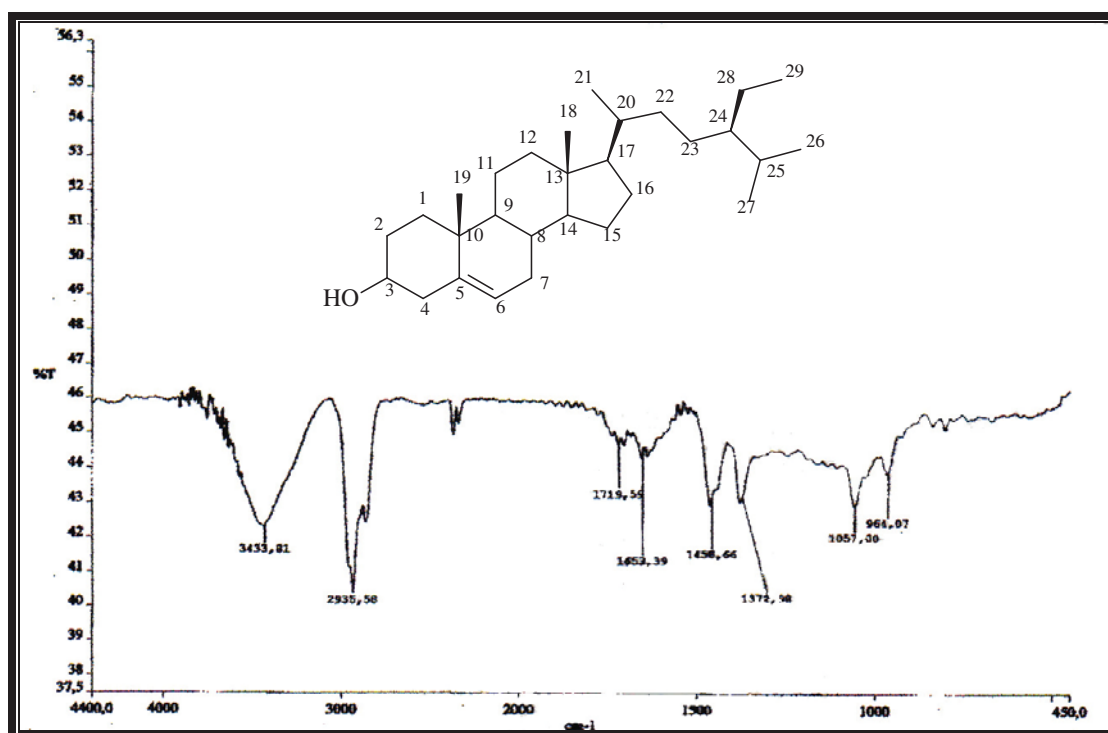


Figura 63: Espectro de IV de EH-2 (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ).

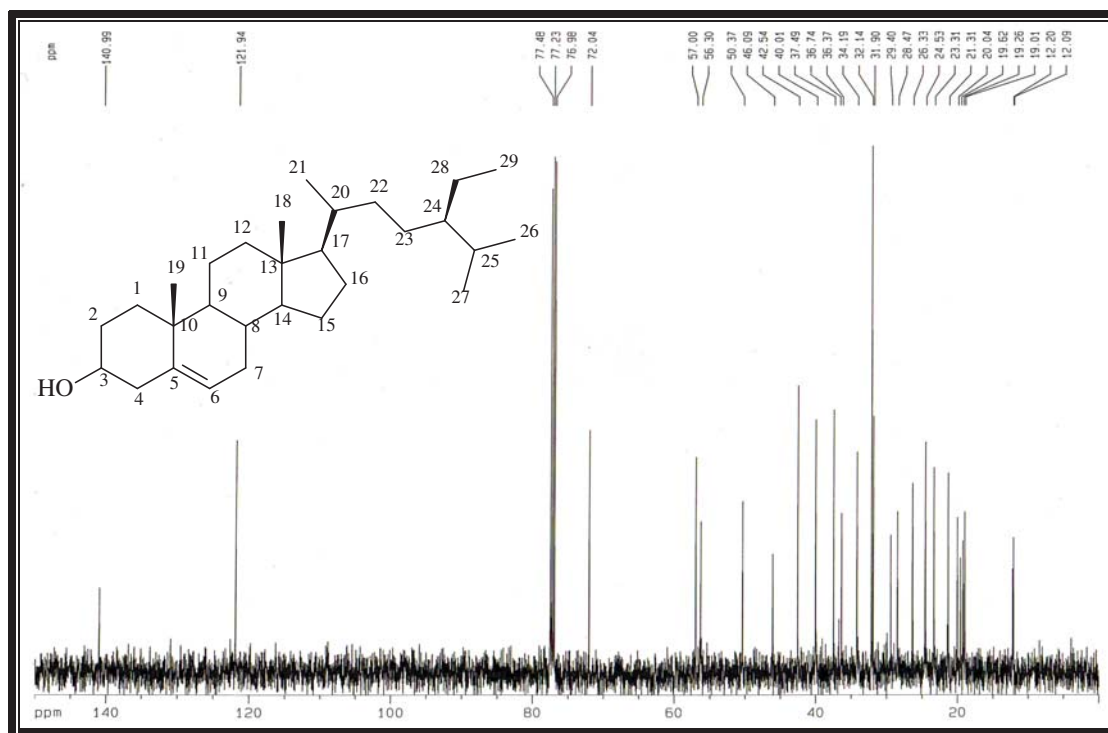


Figura 64: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -BB ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de EH-2.

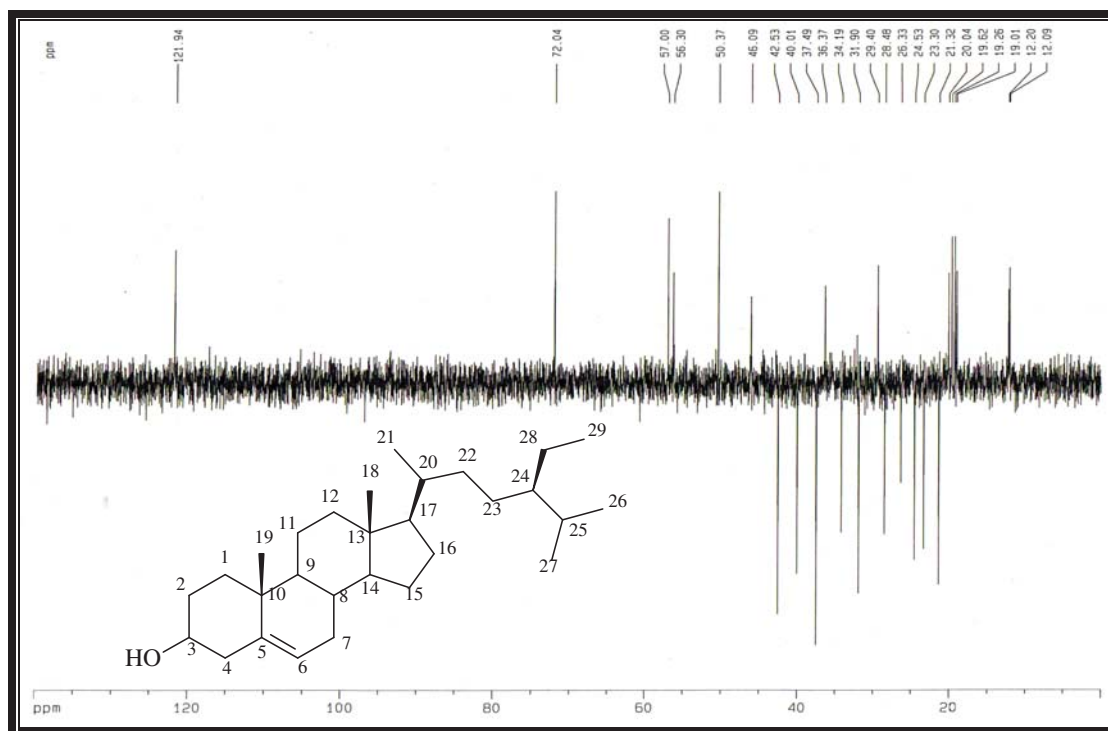


Figura 65: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de EH-2.

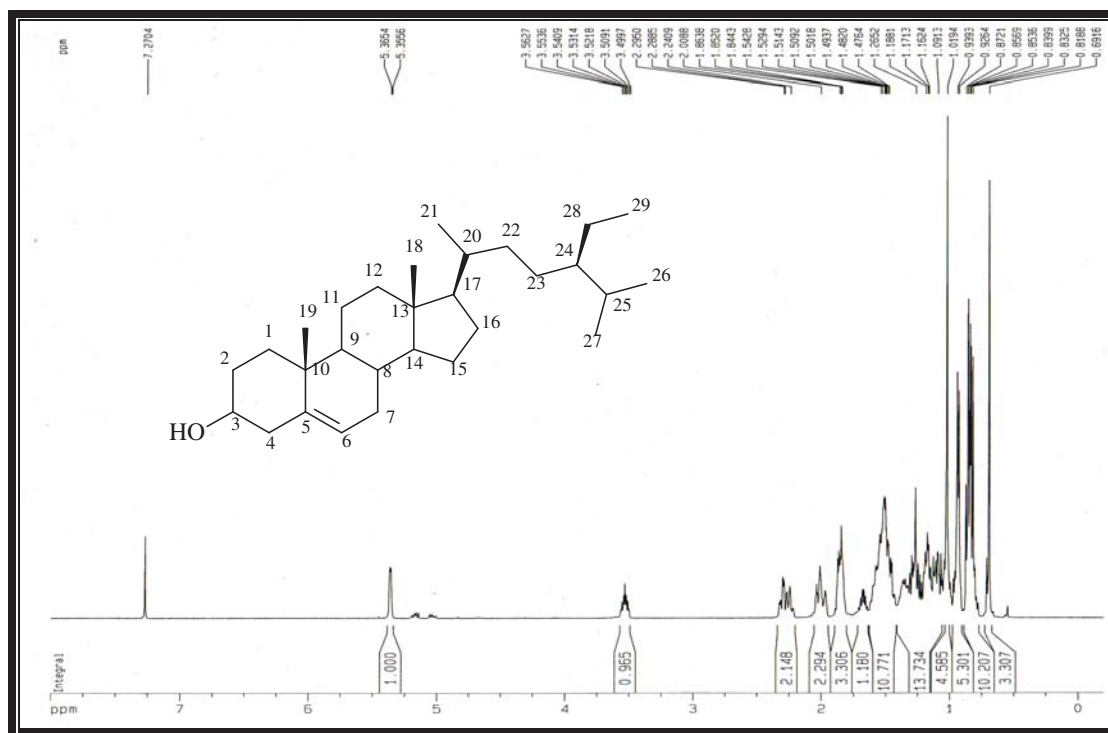


Figura 66: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de EH-2.

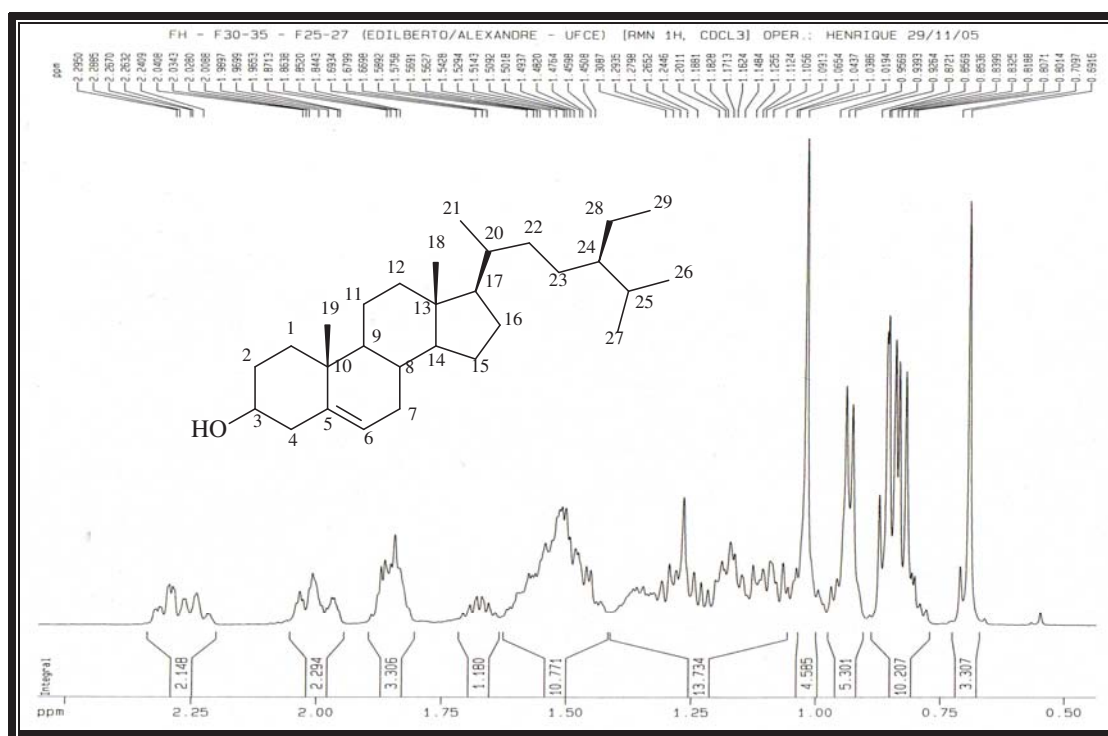


Figura 67: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de EH-2. Expansão da região  $\delta$  0,5 a 2,5.

# Capítulo 4



## Parte Experimental

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 Material Vegetal**

#### **5.1.1 Material Vegetal de *Cissus verticillata***

As folhas de *Cissus verticillata* utilizadas para a preparação de chás, foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará, em janeiro de 2005. Enquanto as folhas para a preparação do extrato etanólico foram coletadas em março de 2005, no mesmo local.

O material vegetal utilizado na decoção era constituído de folhas frescas, enquanto o utilizado para a preparação do extrato etanólico era constituído de folhas desidratadas e trituradas.

O número do registro de *Cissus verticillata* é 32240 e sua exsicata encontra-se no Herbário Prisco Bezerra - UFC.

#### **5.1.2 Material Vegetal de *Myrcia sp.***

O material vegetal de *Myrcia sp.* utilizado para a extração dos óleos essenciais, foi coletado no município de Amontada, no estado do Ceará, em janeiro de 2005. Este material era constituído de ramos completos de *Myrcia sp.*, que foram divididos em três porções: 900 g de folhas frescas, 580 g de frutos e 650 g de talos.

### **5.2 Procedimento Experimental para a extração dos óleos essenciais de *Myrcia sp.***

As três porções: 900 g de folhas frescas, 580 g de frutos e 650 g de talos triturados, foram submetidas ao processo de hidrodestilação utilizando-se de aparelho doseador tipo Clevenger, para a extração de óleos essenciais.

Os 900 g de folhas de *Myrcia sp.* foram divididos em duas porções de 600 g e 300 g. A maior porção foi colocada em um balão de vidro de 5,0 L juntamente com 2,75 L de água e a menor porção foi colocada em um balão de vidro de 5,0 L, juntamente com 2,00 L de água,

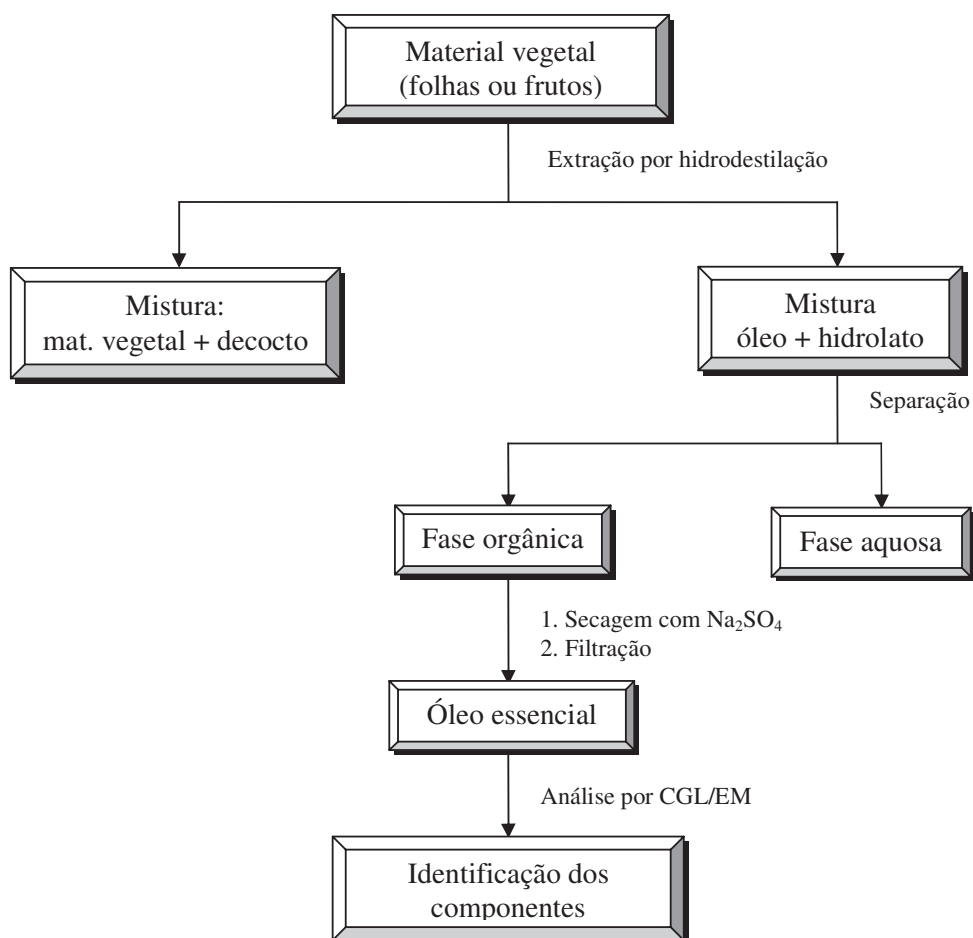
ambas foram mantidas em ebulição durante três horas. As misturas água/óleo, resultantes das duas porções, foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e filtrada, fornecendo 5,25 g de óleo essencial.

Os 580 g dos frutos de *Myrcia sp.* foram colocados em um balão de vidro de 5,0 L juntamente com 1,00 L de água e mantido em ebulição durante três horas. A mistura água/óleo, resultante, foi seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e filtrada, fornecendo 2,55 g de óleo essencial.

Os 650 g dos talos triturados de *Myrcia sp.* foram colocados em um balão de vidro de 5,0 L juntamente com 1,00 L de água e mantido em ebulição durante três horas, não resultando em quantidade significativa de óleo essencial.

O Fluxograma 01, Pág. 78, mostra o procedimento utilizado para a extração do óleo essencial das folhas e dos frutos de *Myrcia sp.*

**Fluxograma 01:** Método de extração do óleo essencial das folhas e dos frutos de *Myrcia sp.*





### 5.3 Métodos Cromatográficos

As cromatografias de adsorção em coluna foram realizadas utilizando-se gel de sílica da Vetec<sup>®</sup> ( $\phi$  mm 0,063-0,200) cód. 195 e gel de sílica 60 da Merck<sup>®</sup> ( $\phi$  mm 0,040-0,063). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostra a serem cromatografadas e adsorventes utilizados.

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana Sephadex LH-20 da Pharmacia Fine Chemicals<sup>®</sup>, utilizando-se metanol puro como fase móvel.

Para as cromatoplasas em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 ( $\phi$  mm 0,002-0,025) sobre alumínio da Merck<sup>®</sup> (com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm).

Os eluentes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções crescentes de polaridade. Os eluentes utilizados nos tratamentos cromatográficos de adsorção sob pressão média foram escolhidos após análise prévia das frações (a serem estudadas) por CCD, a fim de permitir ao constituinte desejado (ou àquele de menor Rf) apresentar Rf próximo de 0,3.

A revelação das substâncias nas cromatoplasas foi feita pela exposição das mesmas à radiação ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm, obtido por lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Light<sup>®</sup>; por pulverização com solução de vanilina-ácido perclórico em etanol seguido de aquecimento em estufa a 100°C por aproximadamente 5 minutos.

### 5.4 Métodos espectrométricos

#### 5.4.1 Espectrometria na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros na Região do Infravermelho (IV) foram realizados na Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, utilizando-se espectrômetro Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo FT-IR SPECTRUM 1000. Pastilhas de Brometo de Potássio (KBr) foram utilizadas para as análises das amostras.

### 5.4.2 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ ) e de Carbono-13 (RMN $^{13}\text{C}$ ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN  $^1\text{H}$ ) e de Carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni e bidimensionais, foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC), utilizando-se espectrômetros Bruker<sup>®</sup> modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DPX-500, que operam na frequência do hidrogênio-1 a 300 MHz e 500 MHz, e na frequência do carbono-13 a 75 MHz e 125 MHz, respectivamente.

Os solventes utilizados nas dissoluções das amostras para a obtenção dos espectros foram: clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO-*d*6), Metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ), comercializados pela Norell<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup> ou Aldrich<sup>®</sup>.

Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados, no caso dos espectros de hidrogênio, pelos picos de hidrogênios pertencentes à fração não-deuterada dos solventes utilizados: clorofórmio ( $\delta$  7,27), água ( $\delta$  4,80), DMSO ( $\delta$  2,50), metanol ( $\delta$  3,31) e piridina ( $\delta$  7,22; 7,58; 8,74). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio ( $\delta$  77,23), DMSO ( $\delta$  39,51), metanol ( $\delta$  49,14) e piridina ( $\delta$  123,87; 135,91; 150,35).

As multiplicidades das bandas nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), t (triplete), q (quarteto) e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi descrito segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado); CH (carbono metínico);  $\text{CH}_2$  (carbono metilênico) e  $\text{CH}_3$  (carbono metílico) e foi determinado através da técnica DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) com ângulo de nutação de  $135^\circ$  ( $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$  com amplitudes em

oposição ao CH<sub>2</sub>). Os carbonos não hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro BB.

### 5.4.3 Espectrometria de Massa e CGL-FID

Os espectros de massa dos óleos essenciais foram obtidos em Espectrômetro de Massa Hewlett-Packard®, modelo HP-5791 A, acoplado a Cromatógrafo Gás-Líquido modelo HP A série II (CGL/EM), provido de coluna capilar DB-5 (dimetilpolisiloxano) com 30,0 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,1 µm. A razão de aquecimento do injetor foi de 35-180°C/4°C/min. e 180-280°C/35°C/min, sendo hélio o gás de arraste. A análise CGL/FID foi efetuada num cromatógrafo Shimadzu® GC-17A equipado com detector FID (Flame Ionization Detector), usando coluna capilar DB-5 (dimetilpolisiloxano) com 30,0 m x 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm, utilizando razão de aquecimento do injetor de 35-180°C/4°C/min. e 180-280°C/17°C/min, utilizando hidrogênio como gás de arraste.

### 5.5 Ponto de Fusão

Os pontos de fusão foram obtidos no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará em um aparelho Mettler®, com placa aquecedora modelo FP90/FP82H7. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 4°C/min.

### 5.6 Decoctos de folhas frescas de *Cissus verticillata*

Amostras de 300g de folhas frescas de *Cissus verticillata* foram submetidas à decocção, por cinco minutos, em 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. As mesmas folhas foram submetidas ao mesmo processo perfazendo um total de 1 litro de decocto. Foram obtidos 4 litros de decocto a partir de 4 amostras num total de 1,2 kg.

As quatro soluções foram liofilizadas fornecendo um total de 29,48 g de material sólido marrom denominado CVFD.

O sólido resultante foi agitado durante 30 minutos em 100 mL de metanol, à temperatura ambiente. Depois de filtrado o resíduo sólido foi novamente agitado em 50 mL de metanol por mais trinta minutos e filtrado, repetindo-se o processo por mais duas vezes. Após evaporação do solvente foram obtidos 15,67 g de um resíduo pastoso marrom escuro que foi denominado CVFDSM e 11,35 g de um resíduo sólido insolúvel em metanol que foi denominado CVFDIM.

Estes procedimentos foram realizados sucessivas vezes para fornecer material (amostras de 2,0 g de CVFDSM e amostras de 1,0 g da fração rica em tiramina) para a continuidade dos testes farmacológicos e para realização dos fracionamentos cromatográficos de CVFDSM em coluna de Sephadex LH-20.

3 porções de 300 g de *Cissus Verticillata* originaram 3,0 L de decocto que após liofilização renderam 15,48 g de material sólido (CVFD). Este foi agitado em metanol originando 10,76 g de material solúvel (CVFDSM) e 4,33 g de material insolúvel (CVFDIM).

Repetição do processo com 4 alíquotas de 300 g de folhas de *C. Verticillata*, forneceu 4,0 L de decocto, que liofilizados renderam 22,31 g de CVFD, que após agitação em metanol foi fracionado em 15,07 g de CVFDSM e 6,27 g de CVFDIM.

O processo foi repetido por mais duas vezes com 4 e 8 porções de 300 g de folhas de *C. Verticillata*, fornecendo 4,0 e 8,0 L de decocto respectivamente, que liofilizados renderam 29,48 e 41,20 g de CVFD. O fracionamento do sólido obtido no primeiro procedimento resultou em 15,68 g de CVFDSM e 11,35 g de CVFDIM, para o segundo foram obtidos 28,50 g de CVFDSM e 11,57 g de CVFDIM.

### **5.6.1. Fracionamento Cromatográfico de CVFDSM**

Inicialmente a partir da primeira obtenção do material solúvel em metanol (CVFDSM) e do material insolúvel em metanol (CVFDIM) de *Cissus Verticillata* relatado no item 5.6, Pág. 81, foram enviadas amostras desses materiais (1,6 g de cada) ao Departamento de

Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para a realização dos testes que visaram avaliar o potencial hipoglicemiante dessas amostras.

Os testes iniciais apresentaram resultados muito significativos para a fração solúvel em metanol (CVFDSM) e motivaram a continuidade dos trabalhos com esta fração.

5,08 g de CVFDSM dissolvidos em 8 mL de MeOH foram cromatografados em coluna de Sephadex LH-20 (100 g) de 5 cm de diâmetro, por eluição com MeOH.

Foram coletadas 24 frações de 9 mL, mais três frações de 125, 250 e 500 mL respectivamente e ainda 500 mL de uma última fração foi coletada tendo como eluente MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1).

Comparação por CCD e revelação sob luz UV permitiu a reunião das frações semelhantes conforme a Tabela 07, representada a seguir.

**Tabela 07:** Fracionamento cromatográfico de CVFDSM.

| <b>Fração</b>             | <b>Massa (g)</b> | <b>%</b>     |
|---------------------------|------------------|--------------|
| CVFDSM-F <sub>1-3</sub>   | 0,0163           | 0,32         |
| CVFDSM-F <sub>4-7</sub>   | 0,0622           | 1,22         |
| CVFDSM-F <sub>8-12</sub>  | 1,2309           | 24,23        |
| CVFDSM-F <sub>13-18</sub> | 1,5456           | 30,42        |
| CVFDSM-F <sub>19-24</sub> | 1,0073           | 19,83        |
| CVFDSM-F <sub>25</sub>    | 0,3099           | 6,10         |
| CVFDSM-F <sub>26</sub>    | 0,2789           | 5,49         |
| CVFDSM-F <sub>27</sub>    | 0,0138           | 0,27         |
| CVFDSM-F <sub>28</sub>    | 0,0815           | 1,60         |
| <b>TOTAL</b>              | <b>4,5464</b>    | <b>89,49</b> |

### 5.6.1.1 Isolamento Cromatográfico de SM-1

A fração CVFDSM-F<sub>19-24</sub> (1,0073 g) foi analisada por RMN de <sup>1</sup>H revelando a presença de tiramina.

Esta fração foi recromatografada em coluna de Sephadex LH-20 (25 g) de 3 cm de diâmetro, por eluição em MeOH. Foram coletadas 12 frações de 9,00 mL.

Comparação por CCD e revelação sob UV permitiu a reunião das frações semelhantes conforme a Tabela 08, indicada abaixo.

**Tabela 08:** Fracionamento cromatográfico de CVFDSM-F<sub>19-24</sub>.

| Fração                                      | Massa (g)     | %            |
|---|---------------|--------------|
| CVFDSM-F <sub>19-24</sub> F <sub>1-3</sub>  | 0,0101        | 1,00         |
| CVFDSM-F <sub>19-24</sub> F <sub>4-5</sub>  | 0,2126        | 21,11        |
| CVFDSM-F <sub>19-24</sub> F <sub>6-8</sub>  | 0,7524        | 74,69        |
| CVFDSM-F <sub>19-24</sub> F <sub>9-12</sub> | 0,0141        | 1,40         |
| <b>TOTAL</b>                                | <b>0,9892</b> | <b>98,20</b> |

A fração CVFDSM-F<sub>19-24</sub>F<sub>6-8</sub> (0,7524 g) foi dissolvida em 8mL de MeOH, acrescentando-se lentamente em seguida 60 mL de acetato de etila, ocorrendo a formação de um precipitado branco, que por filtração foi separado do líquido mãe.

Para melhor purificação do precipitado, este foi redissolvido em 5 mL de MeOH e novamente acrescentou-se lentamente 35 mL de acetato de etila, ocorrendo a formação de um precipitado branco (0,34 mg).

O líquido mãe inicial foi colocado em repouso durante à noite, sob refrigeração, formando um precipitado branco que, depois de filtrado, resultou em 0,050 g.

Os dois precipitados obtidos, denominados SM-1, foram analisados por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C permitindo a identificação dos mesmos como tiramina.

## 5.6.2 Obtenção de frações ricas em tiramina provenientes de *Cissus verticillata* para o estudo de sua ação hipoglicemiante.

Com o fracionamento cromatográfico de CVFDSM foi obtida a fração CVFDSM-F<sub>19-24</sub> (1,0073 g) (item 5.6.1, Pág. 82) que através da análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) (Fig. 52, Pág. 61) e por comparação com o espectro de SM-1, revelou a presença de tiramina. Frações semelhantes a esta, foram obtidas outras vezes a partir da repetição do procedimento descrito.

O fracionamento cromatográfico de 5,00 g de CVFDSM em coluna de Sephadex LH-20 (100 g) de 5 cm de diâmetro, por eluição com MeOH, relatado no item 5.6.1, Pág. 82, foi realizado por mais três vezes, visando a obtenção de frações ricas em tiramina. Tais frações foram identificadas por comparação com a fração padrão através de CCD e pela comparação dos espectros de RMN <sup>1</sup>H das frações, da fração rica em tiramina (CVFDSM-F<sub>19-24</sub>) e o espectro de SM-1, identificada como tiramina.

A obtenção das amostras da fração rica em tiramina foi motivada pelos relatos da literatura, que mostram que a administração crônica de tiramina conduz a uma melhoria da tolerância de glicose em ratos diabéticos (Visentin *et al*, 2005).

Assim, os testes para avaliação dos níveis de lipídeos, triglicérides e níveis de HDL e VLDL em ratos da linhagem Wistar masculinos com *diabetes* aloxan-induzida, foram realizados com a fração solúvel em metanol (CVFDSM), com a fração rica em tiramina e com a tiramina adquirida comercialmente sob a forma de cloridrato de tiramina.

### 5.6.2.1 Obtenção de fração rica em tiramina proveniente do segundo fracionamento cromatográfico de CVFDSM.

5,00 g de CVFDSM dissolvidos em 10 mL de MeOH foram cromatografados em coluna de Sephadex LH-20 (100 g) de 5 cm de diâmetro, por eluição com MeOH. Foram coletadas 20 frações de 10 mL, mais uma fração de 300 mL. A última fração foi coletada com 500 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1).

Comparação por CCD e revelação sob luz UV permitiu a reunião das frações semelhantes conforme a Tabela 09.

**Tabela 09:** Segundo fracionamento cromatográfico de CVFDSM.

| Fração                    | Massa (g)     | %            |
|---------------------------|---------------|--------------|
| CVFDSM-F <sub>1-2</sub>   | 0,1684        | 3,37         |
| CVFDSM-F <sub>3-4</sub>   | 0,3366        | 6,73         |
| CVFDSM-F <sub>5-6</sub>   | 0,5563        | 11,13        |
| CVFDSM-F <sub>7-8</sub>   | 0,5575        | 11,15        |
| CVFDSM-F <sub>9-12</sub>  | 0,8727        | 17,45        |
| CVFDSM-F <sub>13-20</sub> | 1,1513        | 22,35        |
| CVFDSM-F <sub>21</sub>    | 0,5303        | 2,33         |
| CVFDSM-F <sub>22</sub>    | 0,1163        | 11,29        |
| <b>TOTAL</b>              | <b>4,2894</b> | <b>85,79</b> |

A fração CVFDSM-F<sub>13-20</sub>, foi denominada E<sub>2</sub>CVFDSM-F<sub>13-20</sub> e identificada como sendo rica em tiramina, através da comparação do seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 53, Pág. 62) e o espectro de RMN <sup>1</sup>H de SM-1, identificado como tiramina (Fig. 43, Pág. 55) e da fração rica em tiramina obtida no primeiro procedimento cromatográfico (Fig. 52, Pág. 61). Esta fração foi enviada para o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC para a realização dos testes farmacológicos.

#### **5.6.2.2 Obtenção de fração rica em tiramina proveniente do terceiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM.**

5,10 g de CVFDSM dissolvidos em 10,0 mL de MeOH foram cromatografados em coluna de Sephadex LH-20 (100g) de 5cm de diâmetro, por eluição com MeOH. Foram coletadas 21 frações de 10 mL, mais três frações de 100 mL.

Comparação por CCD e revelação sob luz UV permitiu a reunião das frações semelhantes conforme a Tabela 10, Pág. 87.



**Tabela 10:** Terceiro fracionamento cromatográfico de CVFDSM.

| Fração                    | Massa (g)     | %            |
|---------------------------|---------------|--------------|
| CVFDSM-F <sub>1-2</sub>   | 0,1534        | 3,01         |
| CVFDSM-F <sub>3-5</sub>   | 0,5723        | 11,22        |
| CVFDSM-F <sub>6-7</sub>   | 0,9634        | 18,89        |
| CVFDSM-F <sub>8</sub>     | 0,6077        | 11,92        |
| CVFDSM-F <sub>9-10</sub>  | 0,6966        | 13,66        |
| CVFDSM-F <sub>11-19</sub> | 1,0957        | 21,48        |
| CVFDSM-F <sub>20</sub>    | 0,5328        | 10,45        |
| CVFDSM-F <sub>21</sub>    | 0,1158        | 2,27         |
| <b>TOTAL</b>              | <b>4,7377</b> | <b>92,90</b> |

A fração CVFDSM-F<sub>11-19</sub>, foi denominada E<sub>3</sub>CVFDSM-F<sub>11-19</sub> e identificada como sendo rica em tiramina, através da comparação do seu espectro de RMN <sup>1</sup>H (Fig. 54, Pág. 62) com os espectros relatados anteriormente. Esta fração foi também enviada para o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC para a realização dos testes farmacológicos.

### 5.7 Extrato Etanólico de *Cissus verticillata*

2.400 g de folhas frescas de *Cissus verticillata* foram colocadas para desidratar à sombra durante 15 dias, resultando em 205 g (8,54%) de folhas secas.

185,55 g dessas folhas secas foram trituradas e submetidas à extração com etanol a frio, utilizando-se 1,5 L (4x) desse solvente com intervalos de 48, 24, 24 e 24 h respectivamente.

A destilação dos 6,0 litros de solvente, sob pressão reduzida, forneceu 62,75 g de um líquido viscoso marrom denominado de CVFEET.

#### 5.7.1 Partição líquido-líquido de CVFEET

62,75 g de CVFEET foram dissolvidos em 200 mL de etanol e em 200 mL de água destilada e extraído duas vezes com hexano (200 mL e 100 mL respectivamente), seguido de diclorometano (200 mL e 100 mL respectivamente). Foram realizadas ainda cinco extrações

com acetato de etila utilizando-se 100 mL desse solvente e em seguida duas extrações utilizando-se, em cada uma, 100 mL de n-butanol. (Fluxograma 02, Pág. 89).

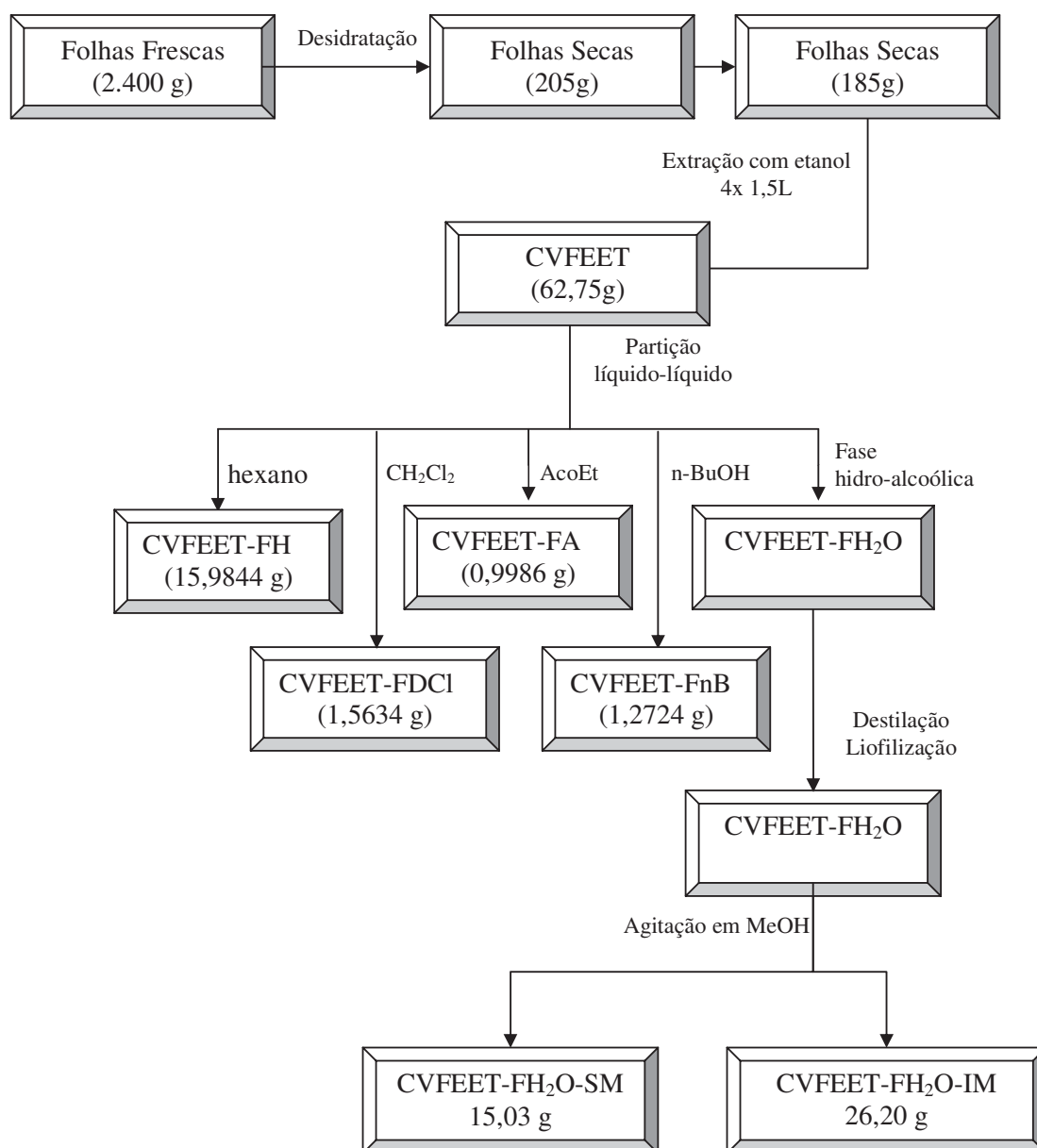
Os extratos obtidos foram concentrados por destilação do solvente sob pressão reduzida e encontram-se descritos na Tabela 11, apresentada abaixo.

**Tabela 11:** Frações da partição líquido-líquido de CVFEET.

| <b>Solvente</b>  | <b>Sigla</b> | <b>Massa (g)</b> |
|------------------|--------------|------------------|
| Hexano           | CVFEET-FH    | 15,9844          |
| Diclorometano    | CVFEET-FDCI  | 1,5634           |
| Acetato de etila | CVFEET-FA    | 0,9986           |
| n-Butanol        | CVFEET-FnB   | 1,2724           |
| <b>TOTAL</b>     |              | <b>19,8188</b>   |

A fase hidro-alcoólica (CVFEET-FH<sub>2</sub>O) foi submetida à destilação sob pressão reduzida para retirada do etanol e posteriormente submetida à liofilização. A amostra liofilizada foi submetida a agitação por 30 minutos em 100 mL de MeOH e filtrada. Este procedimento foi realizado três vezes resultando em 15,03 g de material solúvel em MeOH denominado (CVFEET-FH<sub>2</sub>O-SM) e 26,20 g de material insolúvel em MeOH denominado (CVFEET-FH<sub>2</sub>O-IM). (Fluxograma 02, Pág. 89).

**Fluxograma 02:** Partição líquido-líquido de CVFEET.



### **5.8. Preparação do decocto à partir da torta proveniente da extração com etanol das folhas secas de *Cissus verticillata***

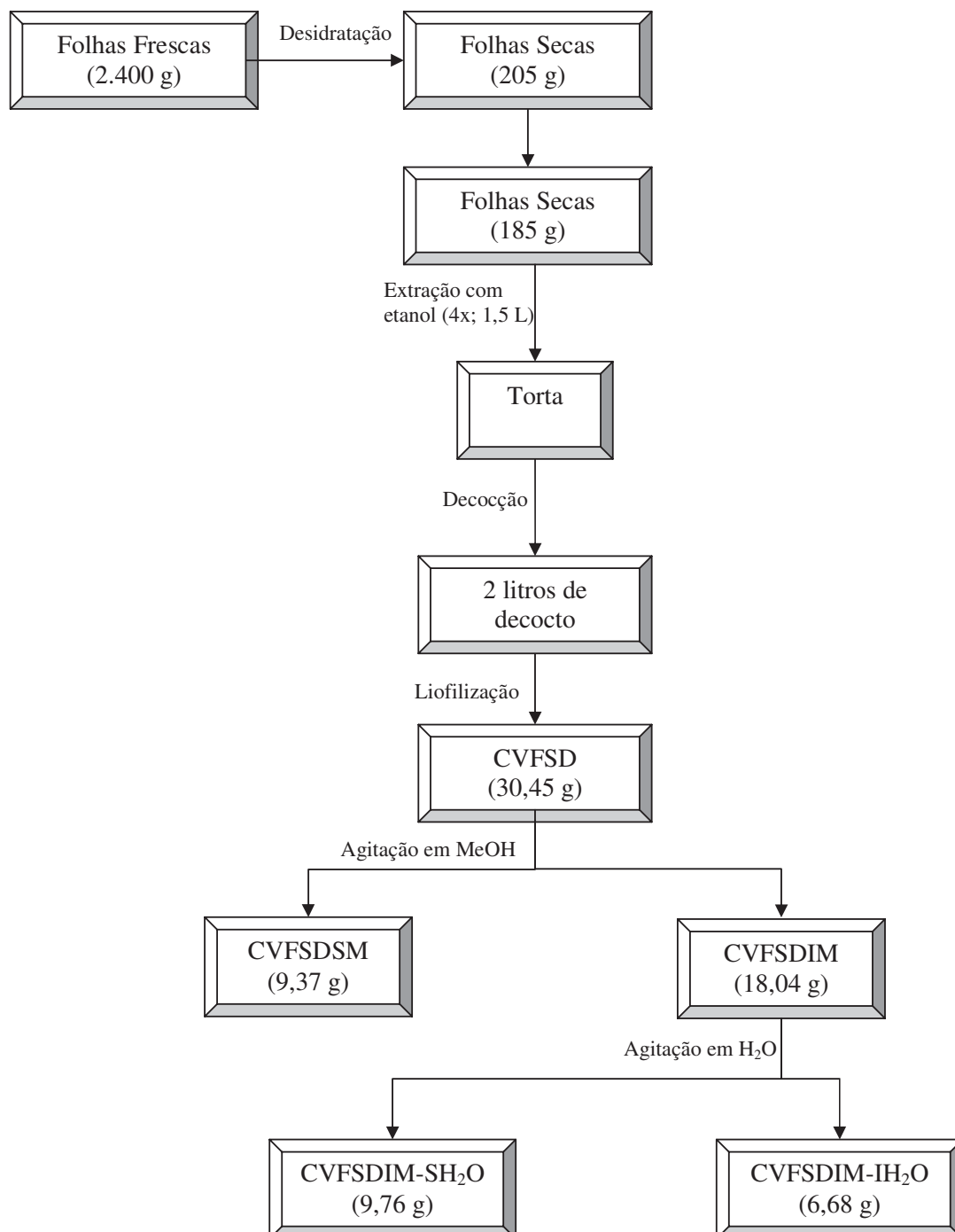
Após a extração com etanol, as folhas secas e trituradas de *Cissus verticillata* foram colocadas em sistema aberto para evaporação de traços do solvente.

A torta foi submetida à decocção em erlenmeyer por 5 minutos em 2,00 L de H<sub>2</sub>O destilada. Após filtração obteve-se 1,00 L de decocto. Em seguida foi adicionado mais 1,00 L de água fervente que após filtração resultou em mais 1,00 L de decocto.

Os dois litros de decocto foram liofilizados resultando em 30,45 g de material sólido marrom denominado CVFSD. Este material foi submetido à agitação por 30 minutos em 100 mL de metanol, à temperatura ambiente. Depois de filtrado o processo foi repetido mais três vezes, resultando em 9,37 g de um resíduo pastoso marrom-escuro solúvel em metanol, denominado CVFSDSM e 18,04 g de resíduo insolúvel em metanol (CVFSDIM).

O sólido insolúvel em metanol (CVFSDIM) foi colocado sob agitação por 30 minutos em 100 mL de água destilada, à temperatura ambiente. Depois de filtrado o processo foi repetido mais duas vezes. A fração aquosa foi submetida à liofilização resultando em 9,76 g de material solúvel em água (CVFSDIM-SH<sub>2</sub>O). O sólido insolúvel em água (CVFSDIM-IH<sub>2</sub>O) resultou em 6,68 g. Estes procedimentos estão relatados no Fluxograma 03, Pág. 91.

**Fluxograma 03:** Partição líquido-líquido de CVFEET e preparação do decocto a partir da torta resultante do extrato etanólico das folhas secas de *Cissus verticillata*.



### **5.9. Fracionamento Cromatográfico de CVFEET-FH**

Uma alíquota de CVFEET-FH (5,00 g), proveniente da partição do extrato etanólico, foi pulverizada juntamente com 10 g de gel de sílica e em seguida aplicada em uma coluna cromatográfica pré-empacotada com gel de sílica (30 g) em hexano e eluída com hexano, sendo coletadas 22 frações de 50 ml cada (F<sub>1</sub> a F<sub>22</sub>). As Frações F<sub>23</sub> a F<sub>40</sub> foram coletadas em volumes de 50 mL tendo como eluente hexano/diclorometano (1:1). As frações F<sub>41</sub> a F<sub>45</sub> (50 mL), F<sub>46</sub> a F<sub>58</sub> (100 mL) foram coletadas tendo como eluente diclorometano. As frações F<sub>59</sub> a F<sub>60</sub> (100 mL) e F<sub>61</sub> a F<sub>65</sub> (50 mL) foram coletadas tendo como eluente clorofórmio/acetato (1:1). As frações F<sub>66</sub> a F<sub>76</sub> (50 mL) e F<sub>77</sub> a F<sub>82</sub> (100 mL) foram coletadas tendo como eluente acetato de etila. As frações F<sub>83</sub> a F<sub>85</sub> foram coletadas em volumes de 200 mL tendo como eluente metanol.

As frações foram concentradas sob pressão reduzida, analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 12, Pág. 93.

**Tabela 12:** Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH.

| <b>Fração</b>                | <b>Massa (g)</b> | <b>%</b>     |
|------------------------------|------------------|--------------|
| CVFEET-FH-F <sub>1</sub>     | 0,1655           | 3,31         |
| CVFEET-FH-F <sub>2-4</sub>   | 0,0941           | 1,88         |
| CVFEET-FH-F <sub>5-8</sub>   | 0,0604           | 1,21         |
| CVFEET-FH-F <sub>9-12</sub>  | 0,0236           | 0,47         |
| CVFEET-FH-F <sub>13-22</sub> | 0,0494           | 0,99         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> | 0,9417           | 18,83        |
| CVFEET-FH-F <sub>26-29</sub> | 0,4993           | 9,99         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> | 0,1803           | 3,61         |
| CVFEET-FH-F <sub>36-40</sub> | 0,1023           | 2,05         |
| CVFEET-FH-F <sub>41-42</sub> | 0,0778           | 1,56         |
| CVFEET-FH-F <sub>43-50</sub> | 1,0497           | 20,99        |
| CVFEET-FH-F <sub>51-52</sub> | 0,0375           | 0,75         |
| CVFEET-FH-F <sub>53-56</sub> | 0,0695           | 1,39         |
| CVFEET-FH-F <sub>57-58</sub> | 0,0520           | 1,04         |
| CVFEET-FH-F <sub>59-60</sub> | 0,1468           | 2,94         |
| CVFEET-FH-F <sub>61-65</sub> | 0,0440           | 0,88         |
| CVFEET-FH-F <sub>66-67</sub> | 0,1147           | 2,29         |
| CVFEET-FH-F <sub>68-69</sub> | 0,0260           | 0,52         |
| CVFEET-FH-F <sub>70-74</sub> | 0,0385           | 0,77         |
| CVFEET-FH-F <sub>75-80</sub> | 0,0250           | 0,50         |
| CVFEET-FH-F <sub>81-82</sub> | 0,0327           | 0,65         |
| CVFEET-FH-F <sub>83</sub>    | 0,6130           | 12,26        |
| CVFEET-FH-F <sub>84</sub>    | 0,1730           | 3,46         |
| CVFEET-FH-F <sub>85</sub>    | 0,0486           | 0,97         |
| <b>TOTAL</b>                 | <b>4,6654</b>    | <b>93,31</b> |

### 5.9.1 Isolamento de EH-1

As frações CVFEET-FH-F<sub>70-74</sub> e CVFEET-FH-F<sub>75-80</sub>, foram reunidas e após evaporação parcial do solvente, apresentaram um precipitado branco, que depois de separado e lavado com clorofórmio, originou 16,00 mg de um sólido branco solúvel em piridina, que foi denominado EH-1.

### 5.9.2 Fracionamento Cromatográfico de CVFEET-FH-F<sub>30-35</sub> e Isolamento de EH-2

A fração CVFEET-FH-F<sub>30-35</sub> (0,1803 g) obtida no item 5.9 (Pág. 92) foi adsorvida em 1,00 g de gel de sílica flash, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 5,00 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 1,00 cm de diâmetro. Utilizou-se como eluente hexano/diclorometano (4:1) para coletar as frações 1 a 21. Utilizando-se como eluente hexano/diclorometano (2:1) foram coletadas as frações 22 a 37 enquanto as frações 38 a 43 foram coletadas com o eluente hexano/diclorometano (1:1). Tais frações foram coletadas em volumes iguais a 8,00 mL. A fração 44 foi coletada com metanol em um volume de 40 mL. Após evaporação do solvente na temperatura ambiente, as frações foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a Tabela 13.

**Tabela 13:** Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH-F<sub>30-35</sub>.

| Fração   | Massa (g)     | %            |
|--|---------------|--------------|
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>1-2</sub>   | 0,0013        | 0,72         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>3</sub>     | 0,0008        | 0,44         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>4-7</sub>   | 0,0021        | 1,16         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>8-12</sub>  | 0,0194        | 10,76        |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>13-15</sub> | 0,0032        | 1,77         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>16-19</sub> | 0,0042        | 2,33         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>20-21</sub> | 0,0019        | 1,05         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>22-24</sub> | 0,0213        | 11,81        |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>25-27</sub> | 0,0199        | 11,04        |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>28-32</sub> | 0,0086        | 4,77         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>33-38</sub> | 0,0028        | 1,55         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>39-43</sub> | 0,0051        | 2,83         |
| CVFEET-FH-F <sub>30-35</sub> -F <sub>44</sub>    | 0,0840        | 46,59        |
| <b>TOTAL</b>                                     | <b>0,1746</b> | <b>96,84</b> |

A fração CVFEET-FH-F<sub>30-35</sub>-F<sub>25-27</sub> (19,9 mg) revelou, após análise por CCD a presença de um “spot” único, mas o sólido branco apresentava pequena presença de impureza amarela. Assim essa fração foi lavada por duas vezes em acetona à frio, resultando em 13,4 mg de sólido branco que foi denominado EH-2.



### 5.9.3 Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH-F<sub>23-25</sub> e isolamento de EH-3

A fração CVFEET-FH-F<sub>23-25</sub> (77,8 mg) obtida no item 5.9 (Pág. 92) foi adsorvida em 1,50 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 10,00 g de gel de sílica em coluna cromatográfica de 3,00 cm de diâmetro. Utilizando-se como eluente hexano, foram coletadas as frações 1 a 15. As frações 16 a 75 foram obtidas tendo como eluente hexano/clorofórmio (10%). As frações 76 a 85 foram eluídas com hexano/clorofórmio (20%). As frações 86 a 89 foram recolhidas com hexano/clorofórmio (30%). As frações 90 a 92 foram coletadas com metanol. Todas as frações tinham o volume de 10 mL.

Após analisadas por CCD foram reunidas as frações semelhantes e agrupadas conforme a Tabela 14.

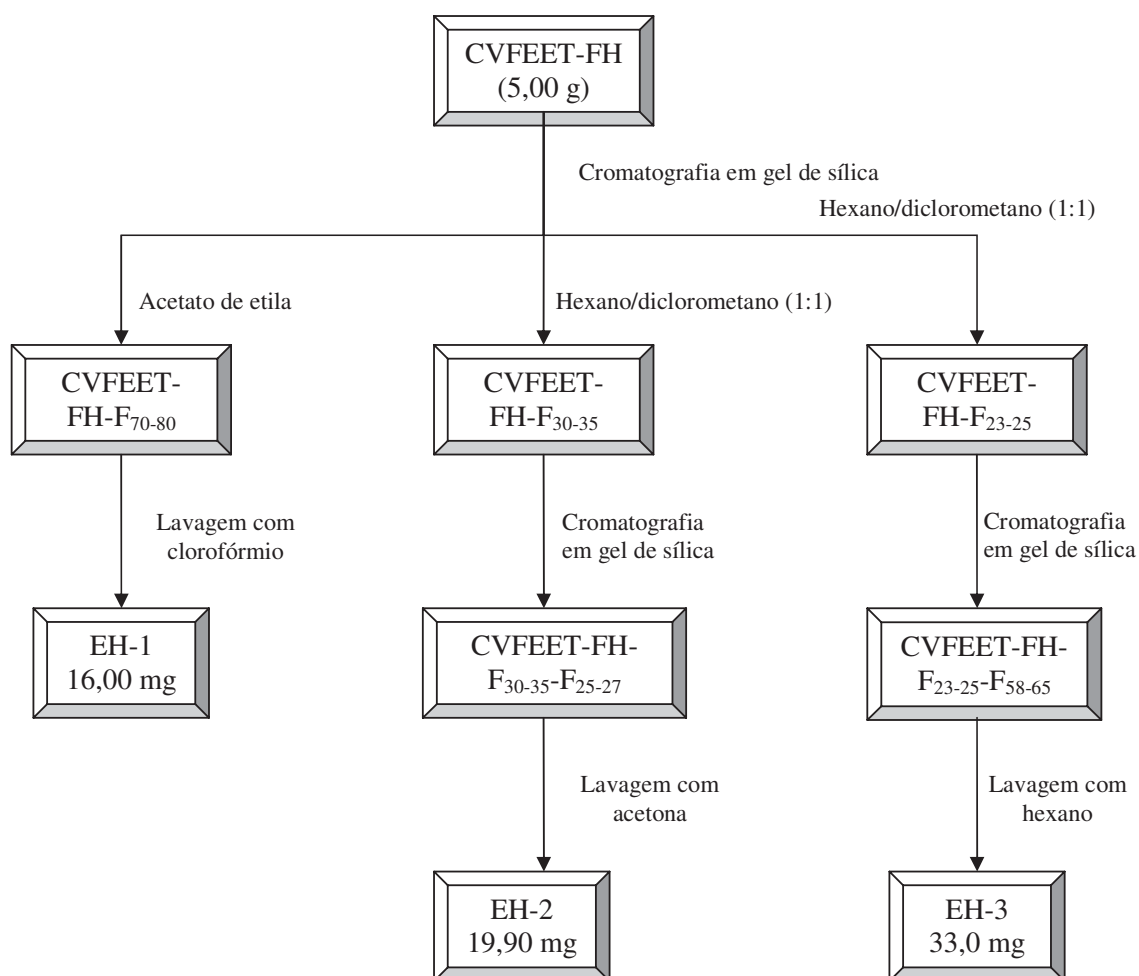
**Tabela 14:** Fracionamento cromatográfico de CVFEET-FH- F<sub>23-25</sub>.

| Fração   | Massa (g)     | %            |
|--|---------------|--------------|
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>1-7</sub>   | 0,0018        | 0,19         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>8-16</sub>  | 0,0232        | 2,46         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>17-25</sub> | 0,0512        | 5,44         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>26-33</sub> | 0,0370        | 3,93         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>34-47</sub> | 0,0493        | 5,24         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>48-57</sub> | 0,0302        | 3,21         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>58-65</sub> | 0,0430        | 4,57         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>66-68</sub> | 0,0215        | 2,28         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>69-75</sub> | 0,0643        | 6,83         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>76-90</sub> | 0,2835        | 30,11        |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>91-95</sub> | 0,1523        | 16,17        |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>96-97</sub> | 0,0740        | 7,86         |
| CVFEET-FH-F <sub>23-25</sub> -F <sub>98-99</sub> | 0,0270        | 2,87         |
| <b>TOTAL</b>                                     | <b>0,8583</b> | <b>91,14</b> |

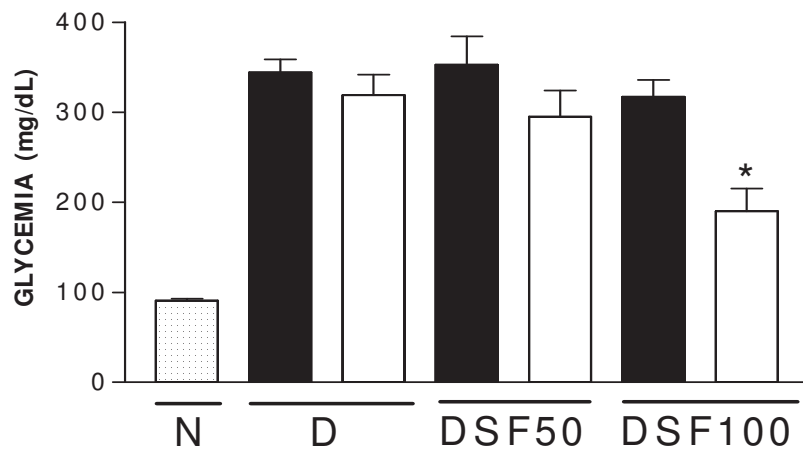
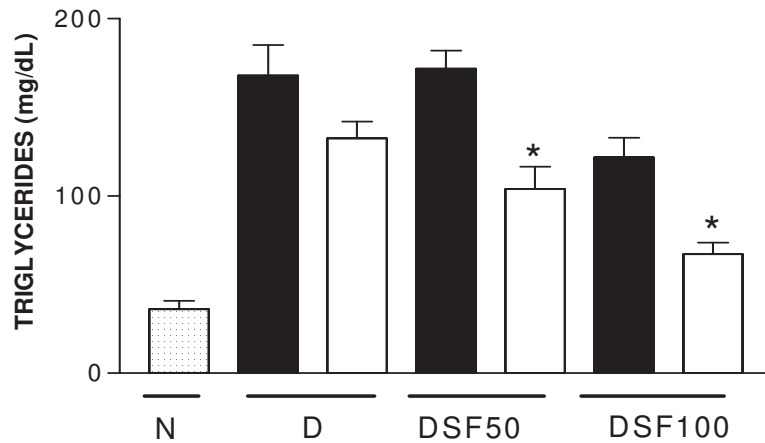
A fração CVFEET-FH-F<sub>23-25</sub>-F<sub>58-65</sub> foi lavada duas vezes em hexano resultando em 33,0 mg de um precipitado branco, denominado EH-3, que após análise por CCD, e observação do espectro de RMN <sup>1</sup>H, sugeriu-se tratar-se de uma mistura dos esteróides β-sitosterol e estigmasterol.

Os procedimentos realizados para os isolamentos de EH-1, EH-2 e EH-3 estão relatados no Fluxograma 04, indicado abaixo.

**Fluxograma 04:** Isolamento de EH-1, EH-2 e EH-3.



# Capítulo 5



## Estudo do Potencial Farmacológico de *Cissus verticillata*

## **6. ESTUDO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DE *Cissus verticillata***

### **6.1. Estudo da Ação Hipoglicemiante da fração de *Cissus verticillata* solúvel em metanol (CVFDSM) (SF\*) e da fração rica em tiramina (CVFDSM–F<sub>19-24</sub>) (TRF\*) em ratos diabéticos**

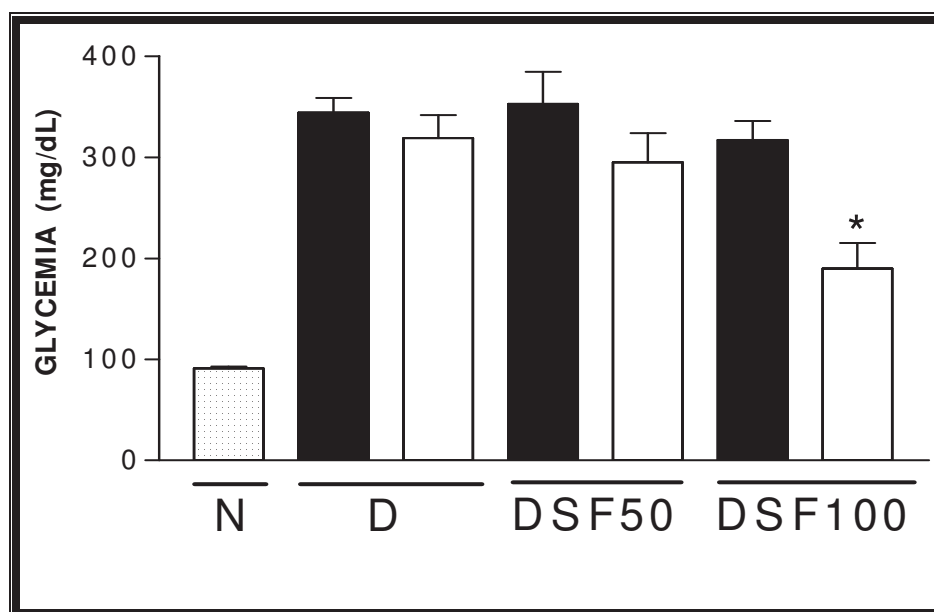
A fração solúvel em metanol (CVFDSM) e a fração rica em tiramina (CVFDSM–F<sub>19-24</sub>) foram enviadas para o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para a realização dos estudos da ação hipoglicemiante em ratos diabéticos. (\*A fração CVFDSM, foi denominada SF e a fração CVFDSM–F<sub>19-24</sub> foi designada TRF pela doutoranda Cleide de Sousa Lino orientada pela profa. Glauce S. B. Viana).

Segundo informações pessoais de Cleide de Sousa Lino, “88 ratos da linhagem Wistar masculinos foram divididos em 8 grupos de 11 animais cada. O primeiro grupo, sem tratamento, foi nomeado como grupo normal (N). O outro, jejuando há 16 h, recebeu aloxan (ALX, 40 mg/kg) pela veia peniana. O estado diabético nestes grupos foi avaliado por medidas do nível de glicose no soro 48 h depois do início do tratamento e normalmente cerca de 40% estavam mortos naquele momento. Animais que apresentaram níveis de glicose abaixo de 200 mg/dL, foram rejeitados. Os grupos foram: normal (N) e diabético (D), foi administrada a fração solúvel em metanol (SF) 50 e 100 mg/kg (SF50 e SF100), mais glibenclamida 5 mg/kg (G). Foi administrada a fração rica em tiramina (TRF), 100 mg/kg (TRF), mais tiramina 1 e 2 mg/kg (T1 e T2). Os animais foram tratados com água destilada (veículo, 10 ml/kg), fração solúvel (SF) 50 e 100 mg/kg, fração rica em tiramina 100 mg/kg, e também glibenclamida de acordo com os padrões 5 mg/kg e tiramina 1 e 2 mg/kg, via oral durante 5 dias, 48 h depois da *diabetes* aloxan-induzida. Somente um grupo foi tratado com aloxan (diabético, D). foram coletadas amostras de sangue cinco dias depois do tratamento.”

De acordo com informações pessoais de Cleide de Sousa Lino, “O Sangue do plexo retro-orbital foi coletado e centrifugado a 3.000 rpm por 10 min, e o nível de glicose foi determinado pelo método enzimático de glicose oxidase-peroxidase (Jogo para Teste

Laboratorial de Glicose, Diagnósticos de Sistemas Ltda., Brasil). Concentrações de triglicérides de soro (TG), colesterol total (TC), lipoproteínas de alta densidade (HDL-C), e lipoproteínas de baixa densidade (VLDL). Os níveis foram medidos através de métodos calorimétricos enzimáticos standards (Trinder, 1969) no espectrofotômetro, modelo Selectra II, marca Winner.”

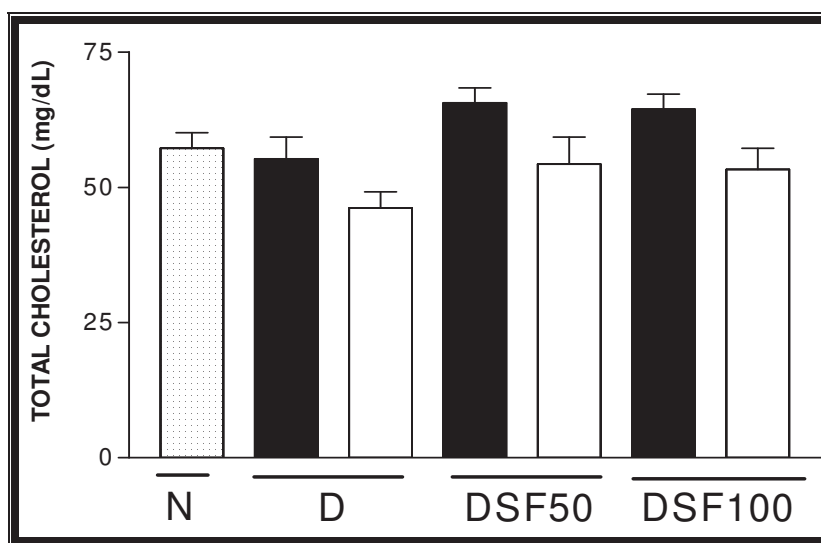
O tratamento oral durante cinco dias com SF na dose de 50 e 100 mg/kg e TRF na dose de 100 mg/kg, tiramina na dose de 1 e 2 mg/kg e Glibenclamida na dose de 5 mg/kg causaram reduções significativas da hiperglicemia, quando comparados ao mesmo grupo antes do tratamento (Fig. 68, Pág. 99 e Tabela 15, Pág. 104). Os animais tratados com SF100 (100 mg/kg) apresentaram uma redução de 40% na glicemia (antes do tratamento:  $316,8 \pm 18,91$ ; depois do tratamento:  $190,0 \pm 24,93$  mg/dL) (Fig. 68, Pág. 99). (Informações pessoais de Cleide de Sousa Lino).



**Figura 68:** Gráfico de avaliação da glicemia em soro de ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100): Glicemia medida em soro de ratos normais ( N ), e diabéticos ( D ) antes (■) e depois (□) do tratamento com água destilada ou com a fração solúvel em metanol 50 mg/kg (SF50) e 100 mg/kg, p.o., (SF100) durante 5 dias. O tratamento dos animais começaram 48 h depois da *diabetes* aloxan-induzida. Controles normais foram usados para comparações. Todos os valores representam SEM mau de 12 a 15 animais. \*p <0.05 quando comparado ao mesmo grupo antes de tratamento.

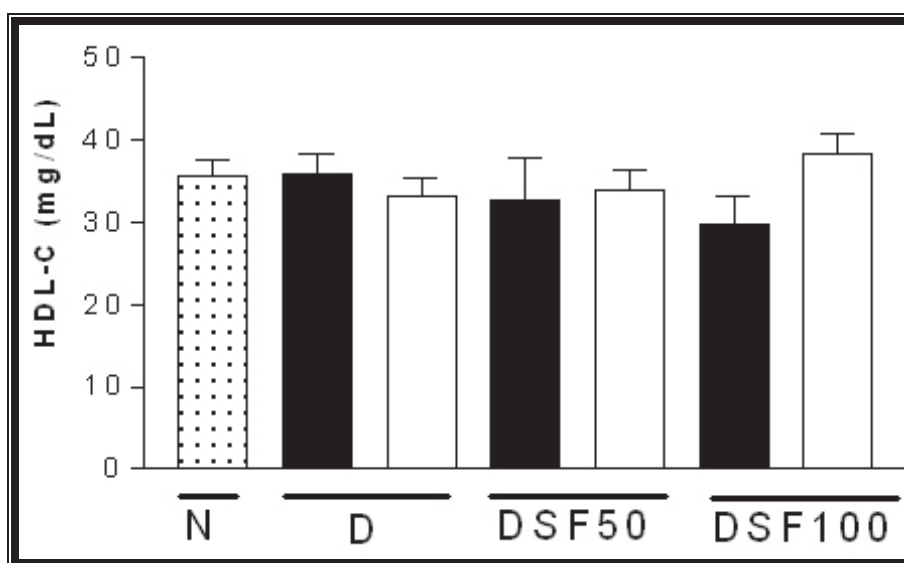
A redução observada com TRF foi de 64% (antes do tratamento:  $442,3 \pm 57,12$  ; depois do tratamento:  $158,7 \pm 20,72$  mg/dL) (Tabela 15, Pág. 104). Semelhantemente, tiramina 2 (2 mg/kg) apresentou a glicemia reduzida em 20% ( $183,3 \pm 26,72$  mg/dL,) (Tabela 16, Pág. 105), quando comparado com os valores antes do tratamento ( $229,5 \pm 14,34$  mg/dL). Além disso, glibenclamida, como esperado, reduziu a glicemia em 58% (antes do tratamento:  $307,6 \pm 23,47$ ; depois do tratamento:  $129,6 \pm 9,26$  mg/dL) (Tabela 16, Pág. 105). (Informações pessoais de Cleide de Sousa Lino).

São apresentados os dados das concentrações de lipídeos nas Figuras 69-72, Págs. 100-103 e nas Tabelas 15 e 16, Págs. 104 e 105. Ocorreram alterações significativas nos níveis de lipídeos no soro dos ratos diabéticos tratados, quando comparados com o mesmo grupo antes do tratamento. A SF não reduziu o colesterol total (Fig. 69, Pág. 100).



**Figura 69:** Gráfico de avaliação dos níveis de colesterol total (TC) em ratos aloxandibéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100): Colesterol total (TC) medido do soro de ratos normais (N) ou diabéticos (D), com a fração solúvel em metanol 50 mg/kg ( DSF50), ou fração solúvel em metanol 100 mg/kg. ( DSF100 ), antes (■) e depois (□) do tratamento com água destilada ou com a fração solúvel 50 e 100 mg/kg,p.o. durante 5 dias. Controles normais foram usados para comparações. Todos os valores representam SEM mau (9-15); \*p <0.05 quando comparados com o mesmo grupo antes de tratamento.

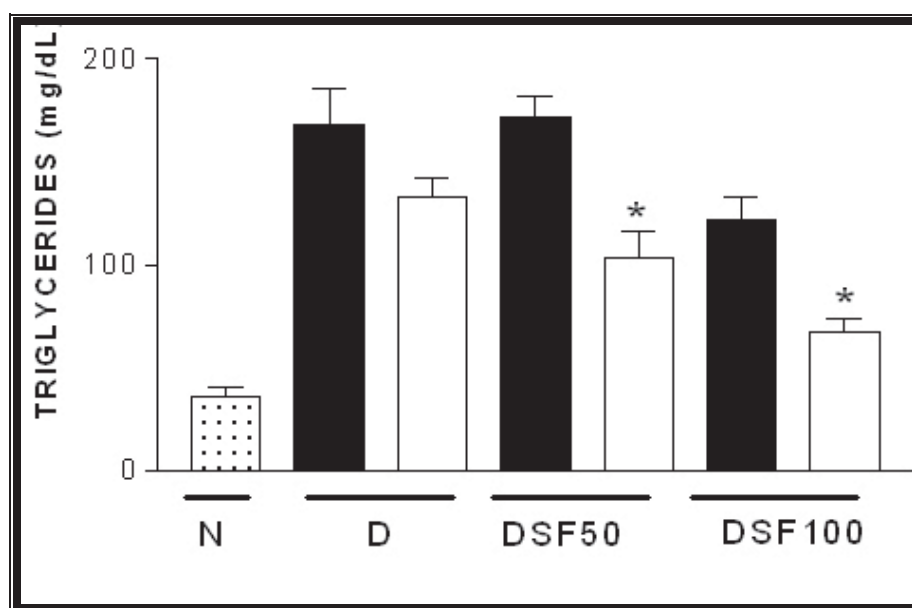
Porém, TRF e tiramina 2 reduziram o colesterol em 25% e 18%, respectivamente (TRF antes do tratamento:  $75,5 \pm 6,36$ ; depois do tratamento:  $56,67 \pm 4,99$  mg/dL; T2 antes do tratamento:  $53,3 \pm 2,63$ ; depois do tratamento:  $43,9 \pm 1,36$  mg/dL) (Tabela 16, Pág. 105). Em relação à HDL, não houve alteração significativa nos valores (Fig. 70, Pág. 101 e Tabela 16, Pág. 105) (Informações pessoais de Cleide de Sousa Lino).



**Figura 70:** Gráfico de avaliação do nível de HDL-C medido do soro de ratos aloxandibéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100): HDL-C medido do soro de ratos normais (N) e diabéticos (D), com a fração solúvel em metanol 50 mg/kg. (DSF50), fração solúvel em methanol 100 mg/kg. (DSF100), antes (■) e depois (□) do tratamento com água destilada ou com a fração solúvel 50 e 100 mg/kg, p.o. durante 5 dias. Controles normais foram usados para comparação. Todos os valores representam SEM mau (11-22); \*p <0.05 quando comparados com o mesmo grupo antes de tratamento.

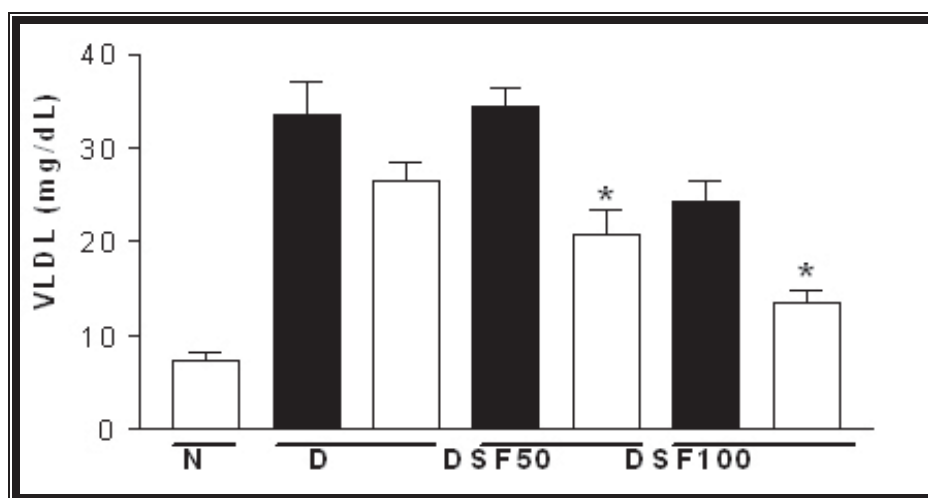
O grupo tratado com a fração solúvel SF50 (50 mg/kg) teve triglicérides e VLDL reduzidos em 39,5%, (depois do tratamento:  $103,9 \pm 12,76$  e  $34,4 \pm 2,05$  mg/dL), quando comparado com os valores antes do tratamento ( $171,8 \pm 10,25$  e  $20,8 \pm 2,55$  mg/dL). Semelhantemente, o grupo tratado com SF100 teve triglicérides (TG) reduzido e VLDL

estimado em 45% (depois do tratamento:  $67,1 \pm 6,7$  e  $13,4 \pm 1,34$  mg/dL), quando comparados ao mesmo grupo antes do tratamento ( $121,8 \pm 11,1$  e  $24,4 \pm 2,22$  mg/dL) (Fig. 71 e 72, Pág. 102 e 103). (Informações pessoais de Cleide de Sousa Lino).



**Figura 71:** Gráfico de avaliação dos níveis de triglicerídeos no soro de ratos aloxandibéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100): Triglicerídeos medidos do soro de ratos normais(N) e diabéticos (D), com uso da fração solúvel em metanol 50 mg/kg. (DSF50) e fração solúvel em metanol 100 mg/kg. (DSF100), antes (■) e depois (□) do tratamento com água destilada ou com a fração solúvel 50 e 100 mg/kg.p.o. durante 5 dias. Controles normais foram usados para comparação. Todos os valores representam SEM mau (5-15); \*p < 0.05 quando comparados com o mesmo grupo antes de tratamento.





**Figura 72:** Gráfico de avaliação dos níveis de VLDL em ratos aloxan-diabéticos antes e após a administração de CVFDSM (DSF50 e DSF100): VLDL medido do soro de ratos normais (N) e diabéticos (D) com a fração solúvel em metanol 50 mg/kg. (DSF50) e fração solúvel em metanol 100mg/kg. (DSF100), antes (■) e depois (□) do tratamento com água destilada ou com a fração solúvel 50 e 100 mg/kg,p.o. durante 5 dias. Controles normais foram usados para comparação. Todos os valores representam SEM mau (5-15); \*p <0.05 quando comparados com o mesmo grupo antes de tratamento.

O TRF produz as mesmas porcentagens de redução (76%) nos triglicérides e nível de VLDL (antes do tratamento:  $359,0 \pm 32,1$  e  $71,8 \pm 6,42$  mg/dL; depois do tratamento:  $86,3 \pm 10,70$  e  $17,3 \pm 2,14$  mg/dL). Semelhantemente, tiramina 1, reduziu os triglicérides e nível de VLDL em 45% (antes do tratamento:  $174,9 \pm 21,9$  e  $35,0 \pm 4,34$  mg/dL; depois do tratamento:  $96,9 \pm 14,28$  e  $19,4 \pm 2,86$  mg/dL), quando comparado ao grupo tiramina 1, depois do tratamento. O tratamento com tiramina 2 também reduziu os triglicérides e os níveis de VLDL em 62% (depois de:  $58,0 \pm 8,54$  e  $11,6 \pm 11,71$  mg/dL), quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento ( $151,1 \pm 12,10$  e  $30,2 \pm 2,42$  mg/dL) (Tabela 16, Pág. 105). Semelhantemente, o grupo tratado com Glibenclamida teve os triglicérides e níveis de VLDL reduzidos em 54% (depois de:  $53,3 \pm 11,63$  mg/dL e  $17,9 \pm 1,97$  mg/dL) quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (antes do

tratamento:  $114,9 \pm 24,10$  e  $34,6 \pm 8,81$  mg/dL). HDL não mostrou nenhuma alteração significativa (Tabela 16, Pág. 105). (Informações pessoais de Cleide de Sousa Lino).

**Tabela 15:** Avaliação da glicemia e dos níveis de lipídeos no plasma de ratos aloxandibéticos antes e depois do tratamento com glibenclamida.

| GRUPOS            | GLICEMIA<br>( mg/dL ) | TC<br>( mg/dL )  | HDL<br>( mg/dL ) | TG<br>( mg/dL )       | VLDL<br>( mg/dL )    |
|-------------------|-----------------------|------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>NORMAL</b>     | $90,90 \pm 1,93$      | $57,20 \pm 2,84$ | $35,64 \pm 2,01$ | $36,08 \pm 4,83$      | $6,1 \pm 0,49$       |
| <b>DIABETICOS</b> |                       |                  |                  |                       |                      |
| Antes             | $344,1 \pm 14,48$     | $55,24 \pm 4,00$ | $35,83 \pm 2,39$ | $167,9 \pm 17,28$     | $33,58 \pm 3,46$     |
| Depois            | $319,0 \pm 22,79$     | $46,15 \pm 3,02$ | $33,19 \pm 2,08$ | $132,6 \pm 9,39$      | $26,52 \pm 1,879$    |
| <b>GLICEMIA</b>   |                       |                  |                  |                       |                      |
| Antes             | $307,6 \pm 23,47$     | $66,71 \pm 6,38$ | $36,00 \pm 2,88$ | $114,9 \pm 24,1$      | $34,64 \pm 8,81$     |
| Depois            | $129,6 \pm 9,26^{*#}$ | $55,39 \pm 2,89$ | $34,83 \pm 4,92$ | $53,26 \pm 11,63^{*}$ | $17,92 \pm 1,97^{*}$ |

Glicemia e perfis de lipídeos do plasma foram medidos do soro de ratos normais, glibenclamida diabéticos e diabéticos. Todos os valores representam SEM mau (6-11). \*p <0.05 quando comparados com o mesmo grupo antes de tratamento.

**Tabela 16:** Avaliação da glicemia e dos níveis de lipídeos no plasma de ratos aloxandibéticos antes e depois do tratamento com a fração rica em tiramina (CVFDSM-F<sub>19-24</sub>) e com tiramina 1 mg/kg e tiramina 2 mg/kg. (T1 e T2).

| GRUPOS             | GLICEMIA<br>( mg/dL ) | TC<br>( mg/dL ) | HDL<br>( mg/dL ) | TG<br>( mg/dL ) | VLDL<br>( mg/dL ) |
|--------------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| <b>NORMAL</b>      | 90,9 ± 1,93           | 57,2 ± 2,84     | 35,6 ± 2,01      | 36,1 ± 4,83     | 7,2 ± 0,97        |
| <b>DIABETICOS:</b> |                       |                 |                  |                 |                   |
| Antes              | 344,1 ± 14,48         | 55,2 ± 4,00     | 35,8 ± 2,39      | 167,9 ± 17,28   | 33,6 ± 3,46       |
| Depois             | 319,0 ± 22,79         | 46,2 ± 3,02     | 33,2 ± 2,08      | 132,6 ± 9,395   | 26,5 ± 1,88       |
| <b>TRF:</b>        |                       |                 |                  |                 |                   |
| Antes              | 442,3 ± 57,12         | 75,5 ± 6,36     | 45,0 ± 3,42      | 359,0 ± 32,11   | 71,8 ± 6,42       |
| Depois             | 158,7 ± 20,72*        | 56,7 ± 4,99*    | 39,0 ± 2,96      | 86,3 ± 10,70*   | 17,3 ± 2,14*      |
| <b>TIRAMINA 1:</b> |                       |                 |                  |                 |                   |
| Antes              | 266,9 ± 10,91         | 64,0 ± 2,62     | 33,5 ± 1,19      | 174,9 ± 21,72   | 35,0 ± 4,34       |
| Depois             | 232,6 ± 16,68         | 55,5 ± 5,83     | 40,0 ± 2,55      | 96,9 ± 14,28*   | 19,4 ± 2,86*      |
| <b>TIRAMINA 2:</b> |                       |                 |                  |                 |                   |
| Antes              | 229,5 ± 14,34         | 53,3 ± 2,63     | 25,7 ± 3,47      | 151,1 ± 12,10   | 30,2 ± 2,42       |
| Depois             | 183,3 ± 26,72         | 43,9 ± 1,36*    | 33,3 ± 2,48      | 58,0 ± 8,54*    | 11,6 ± 1,71*      |

Glicemia e perfis de lipídeos foram medidos em soro de ratos de normais, diabéticos, e os ratos diabéticos tratados com a fração rica em tiramina (TRF), Tiramina 1mg/kg e Tiramina 2mg/kg (T1 e T2) antes e depois do tratamento durante cinco dias. Todos os valores representam SEM mau (6-11). \*p <0.05 quando comparados com o mesmo grupo antes de tratamento.

Em conclusão, os resultados mostraram que a administração oral da fração solúvel (SF) e a da fração rica em tiramina (TRF) de *Cissus verticillata* tiveram um efeito benéfico em ratos diabéticos, reduzindo a hiperglicemia, como também a hiperlipidemia, semelhantemente isso foi apresentado pela tiramina comercial. Dados na literatura relacionam alguns flavonóides e tiramina como possuidores de efeitos hiperglicêmicos e hipotrigliceridêmicos em animais diabéticos (Di Carlo, 1999; Visentin *et al*, 2005). Então, estudos com flavonóides e tiramina, como também outros componentes presentes na planta, são fundamentais para avançar na elucidação do mecanismo de ação e envolvimento com as propriedades antidiabéticas atribuídas a *C. verticillata*. Os resultados justificam o uso popular de *C. verticillata*, mostrando o benefício potencial do extrato aquoso da planta como um medicamento alternativo, no tratamento de *diabetes mellitus* tipo 2.

Estes resultados são importantes, pois confirmam a ação hipoglicemiante de *C. verticillata*, indo ao encontro dos resultados favoráveis à ação hipoglicemiante de *C. Verticillata*, obtidos preliminarmente e relatos na literatura (Pepato *et al*, 1998; Barbosa *et al*, 2002; Viana *et al*, 2004) e opondo-se aos resultados obtidos por Beltrame (2001) que atribuiu um efeito diabetogênico e não diabético ao extrato de *C. verticillata*.

Destaca-se ainda por relacionar pela primeira vez na literatura a tiramina como substância responsável pela ação hipoglicemiante de *C. verticillata*. Os estudos feitos sobre a ação hipoglicemiante de *C. verticillata* que comprovam a sua ação hipoglicemiante supõem que os flavonóides existentes na planta sejam responsáveis pela referida ação. (Pepato *et al*, 1998; Barbosa *et al*, 2002).

Diversos estudos relatam o potencial hipoglicemiante da tiramina. Segundo Visentin *et al*, (2003), “A amina tiramina biogênica é bastante utilizada para estimular o transporte de glicose *in vitro* nos adipocitos, cardiomiocitos e músculo esquelético, e por melhorar a utilização de glicose *in vivo* em ratos. No referido trabalho foi testado se o tratamento prolongado de tiramina poderia melhorar a tolerância de glicose em ratos diabéticos streptozotocin-induzidos. A tiramina foi administrada durante 3 semanas em ratos diabéticos com aplicação de injeções diárias de 29 micromols/kg por i.p. isoladamente ou

em combinação com vanádio 0,02 micromol/kg. Em outro grupo de ratos diabéticos, a tiramina foi administrada subcutaneamente a 116 micromols/kg/dia através de minibombas osmóticas. **Todos os tratamentos com a tiramina resultaram em uma diminuição das respostas hiperglicêmicas.** Porém, os animais diabéticos que receberam tiramina por três semanas não se recuperaram da hiperglicemia, da hipoinsulinemia e da glicosúria.”

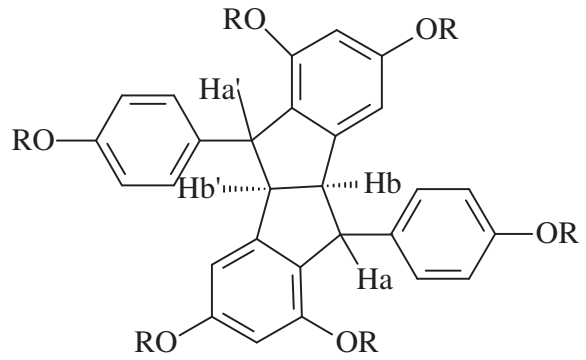
Zorzano *et al* (2002), estudou o efeito da combinação de outras aminas, particularmente a benzilamina e a tiramina, e compostos de vanádio IV e V no tratamento e prevenção de *diabetes mellitus*. “Nós temos evidenciado que em ratos diabéticos streptozotocin-induzidos (um modelo *diabetes* do tipo 1), a administração crônica de benzilamina e vanádio melhora a hiperglicemia. A administração crônica de benzilamina e vanádio melhora a hiperglicemia e estimula a quantidade de glicose através dos adipócitos de ratos. A combinação de benzilamina e vanádio causa os seguintes efeitos: a) incremento da primeira fase de secreção de insulina depois do tratamento agudo com benzilamina e uma baixa dosagem de vanádio, b) aumento na tolerância de glicose também depois da administração aguda de benzilamina e vanádio, c) melhora da hiperglicemia e d) reversão da resistência de insulina no músculo depois do tratamento crônico com benzilamina e vanádio. Preferencialmente os compostos com vanádio são sais de vanádio e complexos de vanádio e as aminas são tiramina e benzilamina.”

De acordo com Visentin *et al*, (2005), “Quando testada *in vitro* em doses milimolares, **a tiramina causou uma grande estimulação do transporte de glicose nos adipócitos de ratos e em músculos esqueléticos e cardíacos.** Em administração *in vivo* de tiramina (4 mg/kg i.p.) diminuiu as respostas de hiperglicemia para o controle da glicose em ratos streptozotocin-tratados. Foi obtido este efeito positivo na diminuição de glicose sem a utilização de vanádio.”

Os resultados obtidos nos testes farmacológicos de *C. verticillata*, especialmente para as frações ricas em tiramina (CVFDSM-F19-24, E2CVFDSM-F13-20 e E3CVFDSM-F11-19) e tiramina (SM-1), e a comprovação na literatura da ação da tiramina como hipoglicemiante em ratos diabéticos, mostram que os objetivos deste trabalho foram

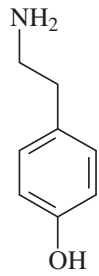
atingidos, isolando-se de *C. verticillata* uma substância de comprovado efeito hipoglicemiante.

# Capítulo 6

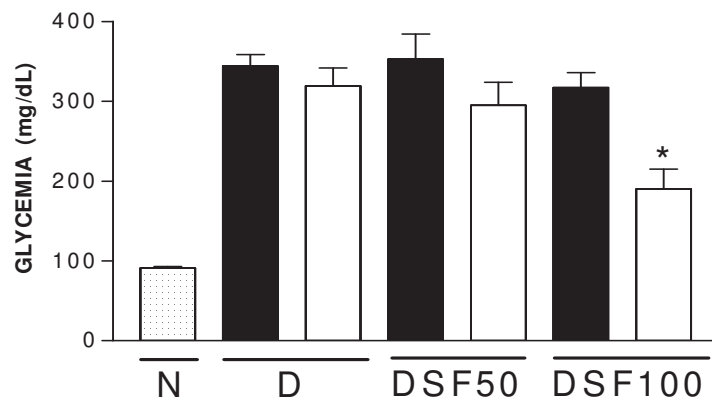


R = H; Ar(eq); H<sub>A,A'</sub>(ax)

**Palidol**



**Tiramina**



# Conclusão

## 7. CONCLUSÃO

A análise dos constituintes dos óleos essenciais das folhas (GAOFOLHAS) e dos frutos (GAOFRUTOS) de *Myrcia sp.*, mostrou que esses óleos são constituídos por sesquiterpenos, tendo  $\beta$ -elemeno (23,38%), germacreno D (12,87%) e  $\alpha$ -cadinol (15,20%) como constituintes majoritários do primeiro óleo e  $\beta$ -elemeno (29,65%), *trans*-cariofileno (9,97%), germacreno D (28,28%) e  $\alpha$ -selineno (8,11%) como constituintes majoritários do segundo óleo.

Sucessivos tratamentos cromatográficos da fração metanólica (CVFDSM) proveniente do decocto das folhas frescas de *Cissus verticillata* permitiram a obtenção do 4-(2-aminoetil)fenol (tiramina), substância inédita para o gênero *Cissus*. Os testes realizados com tiramina mostraram redução na glicemia, colesterol total, triglicérides e níveis de VLDL em ratos com diabetes aloxan-induzida, e aumento nos níveis de HDL. Estes resultados são ratificados por artigos mais recentes da literatura quando relatam que a administração crônica de tiramina conduz a uma melhoria da tolerância de glicose em ratos diabéticos.

A fração hexânica (CVFEET-FH) proveniente da partição do extrato etanólico das folhas secas de *Cissus verticillata* permitiu o isolamento dos esteróides  $\beta$ -sitosterol-glicosilado (EH-1), do  $\beta$ -sitosterol (EH-2) e a obtenção de uma mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

Os resultados apresentados nesta dissertação confirmam a ação hipoglicemiante de *C. verticillata*, relatada preliminarmente na literatura por alguns trabalhos que investigaram o seu potencial antidiabético. (Pepato *et al*, 1998; Pepato *et al*, 2003; Barbosa *et al*, 2002; Viana *et al*, 2004) e opõem-se aos resultados obtidos por Beltrame (2001) que atribuiu um efeito diabetogênico e não diabético ao extrato de *C. verticillata*.

Este trabalho relaciona de forma inédita na literatura a tiramina como substância responsável pela ação hipoglicemiante de *C. verticillata*. Opondo-se também a relatos de



que a ação hipoglicemiante de *C. verticillata* deve-se, supostamente, à existência de flavonóides no decocto de suas folhas. (Pepato *et al*, 1998; Barbosa *et al*, 2002).

Os testes farmacológicos com a fração solúvel em metanol (CVFDSM), com as frações ricas em tiramina (CVFDSM-F19-24, E2CVFDSM-F13-20 e E3CVFDSM-F11-19) e com a tiramina (SM-1), e a comprovação na literatura da ação da tiramina e da benzilamina, como hipoglicemiantes em ratos diabéticos, mostram que os objetivos deste trabalho foram alcançados, isolando-se de *C. verticillata* o “princípio ativo” responsável pelo seu comprovado efeito hipoglicemiante e a sua ação nos níveis de HDL, VLDL, colesterol total e triglicérides *in vivo*. (Sales *et al*, 2005).

Os resultados obtidos até o momento, a partir do decocto e do extrato etanólico das folhas de *C. verticillata*, confirmam o grande potencial químico-botânico-farmacológico desta espécie e justificam a continuidade dos estudos, não apenas para esta espécie, mas também para outros representantes do gênero *Cissus*, tanto pelos trabalhos de estudos farmacológicos publicados na literatura, como pelas substâncias isoladas a partir de algumas de suas espécies. (D’Ambrósio *et al*, 1994; Fritzeimer *et al* 1981).

# Capítulo 7



Constantes Físicas e Dados Espectroscópicos

## 8. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROSCÓPICOS

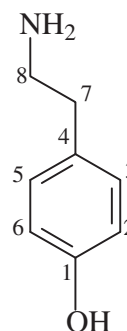
### 8.1 SM-1: Tiramina ou 4-(2-aminoetil)fenol

**Fórmula molecular:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO

**Massa molecular:** 137 u

**Aspecto:** sólido amorfo levemente amarelado

**Solubilidade:** metanol



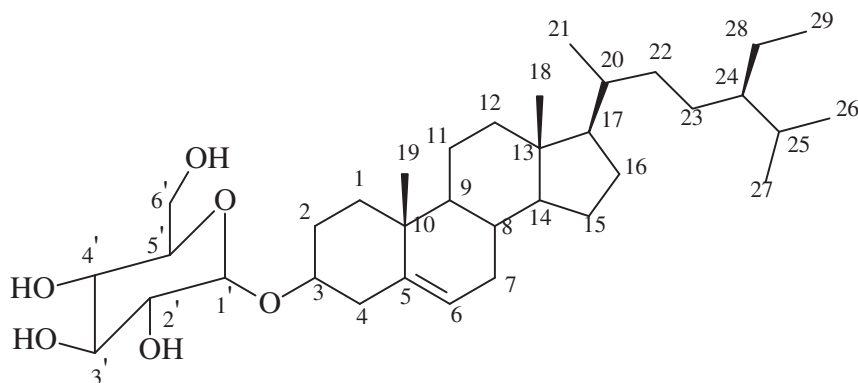
**Espectroscopia no Infravermelho (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 553; 656; 775; 833; 946; 1022; 1112; 1140; 1223; 1256; 1354; 1385; 1462; 1496; 1612; 2920; 3104; 3504.

**Espectrometria de massa (IE, 70 eV):** 36; 38; 39; 51; 53; 55; 65; 77; 79; 91; 107; 108; 109; 120; 137.

**Espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, MeOD):**  $\delta$  (integração, multiplicidade, constante de acoplamento): 2,87  $\delta$  (2H, t,  $J = 7,7$  Hz); 3,12  $\delta$  (2H, t,  $J = 7,7$  Hz); 6,77  $\delta$  (2H, d,  $J = 8,4$  Hz); 7,10  $\delta$  (2H, d,  $J = 8,4$  Hz).

**Espectroscopia de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, MeOD):**  $\delta$  (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): 33,9 (CH<sub>2</sub>, C-7); 42,4 (CH<sub>2</sub>, C8); 116,9 (CH, C-2/C-6); 128,6 (CH, C-4); 130,9 (CH, C-3/C-5); 157,8 (CH, C-1).

## 8.2 EH-1: glicosídeo do $\beta$ -sitosterol



**Fórmula molecular:**  $C_{35}H_{60}O_6$

**Massa molecular:** 576 u

**Aspecto:** sólido amorfo branco

**Solubilidade:** piridina

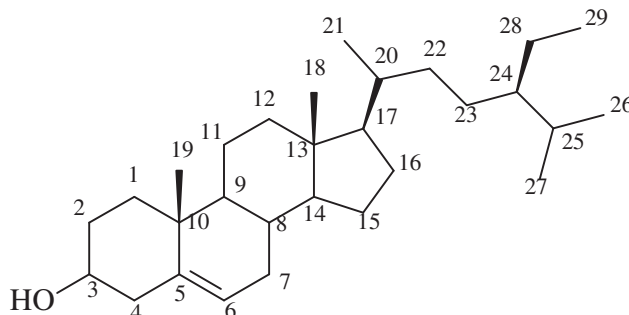
**P.F.:** 289-292°C

$[\alpha]_D^{25}$ : + 65,49°

**Espectroscopia de RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (integração, multiplicidade, constante de acoplamento):** 0,69 (3H, s); 0,90 (s); 0,96 (s); 1,01 (d,  $J = 5,1$  Hz); 1,11-2,14 (m); 2,50 (1H, t,  $J = 11,7$  Hz); 2,75 (1H, t,  $J = 13,3$  Hz); 4,08 (3H, m); 4,31 (2H, m); 4,43 (1H, m); 4,58 (1H, d,  $J = 11,6$  Hz); 5,07 (d,  $J = 6,7$  Hz); 5,38 (1H, s).

**Espectroscopia de RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $C_5D_5N$ ):  $\delta$  (padrão de hidrogenação, correlação estrutural):** 12,5 ( $CH_3$ , C-29); 12,7 ( $CH_3$ , C-18); 19,5 ( $CH_3$ , C-21); 19,8 ( $CH_3$ , C-19); 19,9 ( $CH_3$ , C-27); 20,4 ( $CH_3$ , C-26); 21,8 ( $CH_2$ , C-11); 23,9 ( $CH_2$ , C-28); 25,0 ( $CH_2$ , C-15); 27,0 ( $CH_2$ , C-23); 29,0 ( $CH_2$ , C-16); 30,1 ( $CH_2$ , C-2); 30,8 (CH, C-25); 32,6 (CH, C-8); 32,7 ( $CH_2$ , C-7); 34,8 ( $CH_2$ , C-22); 36,9 (CH, C-20); 37,5 (C, C-10); 38,0 ( $CH_2$ , C-1); 39,9 ( $CH_2$ , C-4); 40,5 ( $CH_2$ , C-12); 43,0 (C, C-13); 46,6 (CH, C-24); 50,9 (CH, C-9); 56,8 (CH, C-17); 57,4 (CH, C-14); 63,4 ( $CH_2$ , C-6'); 72,3 (CH, C-4'); 75,8 (CH, C-5'); 78,7 (CH, C-2'); 78,9 (CH, C-3'); 79,1 (CH, C-3); 103,1 (CH, C-1'); 122,4 (CH, C-6); 141,5 (C, C-5).

### 8.3 EH-2: $\beta$ -sitosterol



**Fórmula molecular:**  $C_{29}H_{50}O$

**Massa molecular:** 414 u

**Aspecto:** Cristais brancos em forma de agulha

**Solubilidade:** clorofórmio

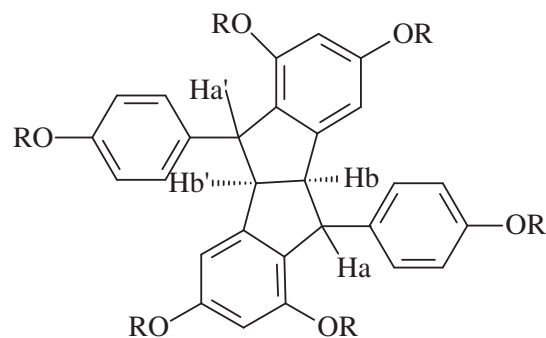
**P.F.:** 116,0-117°C

**Espectroscopia no Infravermelho (KBr,  $cm^{-1}$ ):** 964; 1057; 1372; 1458; 1653; 1719; 2935; 3433

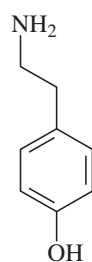
**Espectroscopia de RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (integração, multiplicidade, constante de acoplamento): 0,69 (3H, s); 0,87 – 0,80 (m); 1,02 (3H, s); 0,91 (d,  $J = 6,45$  Hz); 1,50 (m); 1,85 (m); 2,01 (2H, m); 2,29 (2H, m); 3,53 (1H, m); 5,36  $\delta$  (1H, d,  $J = 5,0$  Hz).

**Espectroscopia de RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (padrão de hidrogenação, correlação estrutural): 12,1 ( $CH_3$ , C-29); 12,2 ( $CH_3$ , C-18); 19,0 ( $CH_3$ , C-21); 19,3 ( $CH_3$ , C-27); 19,6 ( $CH_3$ , C-19); 20,0 ( $CH_3$ , C-26); 21,3 ( $CH_2$ , C-11); 23,0 ( $CH_2$ , C-28); 24,5 ( $CH_2$ , C-15); 26,3 ( $CH_2$ , C-23); 28,5 ( $CH_2$ , C-16); 29,4 (CH, C-25); 31,9 ( $CH_2$ , C-2); 31,9 ( $CH_2$ , C-7); 32,1 (CH, C-8); 34,2 ( $CH_2$ , C-22); 36,4 (CH, C-20); 36,7 (C, C-10); 37,5 ( $CH_2$ , C-1); 40,0 ( $CH_2$ , C-12); 42,5 ( $CH_2$ , C-4); 42,5 (C, C-13); 46,1 (CH, C-24); 50,4 (CH, C-9); 56,3 (CH, C-17); 57,0 (CH, C-14); 72,0 (CH, C-3); 121,9 (CH, C-6); 141,0 (C, C-5).

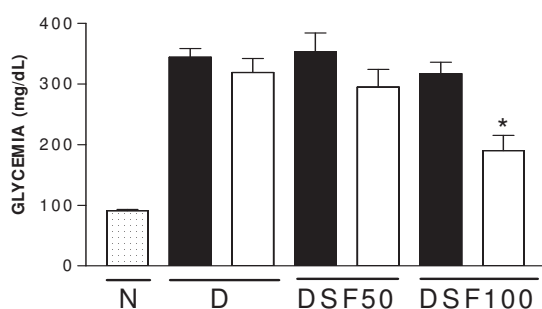
# Capítulo 8



R = H; Ar(eq); H<sub>A,A'</sub>(ax) **Palidol**



**Tiramina**



## Referências Bibliográficas

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; GEROMEL, C.; CASTRO, E. M. Evaluation of different concentrations of auxins and plant explant types on the induction and growth of callus of *Cissus sicyoides* L., a medicinal plant. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 5 (2), 83-89, 2003.

ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, USA, 2001, 456 p.

ADESANYA, S. A.; NIA, R.; MARTIN, M. T.; BOUKAMCHA, N.; MONTAGNAC, A.; PAIES, M. Stilbene derivatives from *Cissus quadrangularis*. **J. Nat. Prod.**, 62 (12), 1694-1695, 1999.

AHMED, A. A.; DE ADAMS, A.; EL-SEEDIC, H. R.; MABRY, T. J. Two phenolics from *Cissus sicyoides*. **Revista Latinoamericana de Química**, 28 (1), 40-42, 2000.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices simulation essential oil analysis. **Química Nova**, 13 (4), 282, 1990.

AL-SAID, M. S.; KHALIFA, A. S.; AL-AZIZI, M. M. Flavonoids from *Cissus digitata*. **International Journal of Pharmacognosy**, 29 (4), 281-283, 1991.

BARBOSA, W. L. R.; DOS SANTOS, W. R. A.; PINTO, L. N.; TAVARES, I. C. C. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 12, supl., 13-15, 2002.

BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do efeito antidiabético do *Cissus sicyoides* L (Vitaceae). **Química Nova**, 24, 783-785, 2001.

BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CORTEZ, D. A. G. Coumarin glycoside

from *Cissus sicyoides*. **Natural Product Letters**, 16 (4), 213-216, 2002.

BHUTANI, K. K.; KAPOOR, R.; ATAL, C. K. Investigations of medicinal plants. Part II. Two unsymmetric tetracyclic triterpenoids from *Cissus quadrangularis*. **Phytochemistry** (Elsevier), 23 (2), 407-410, 1984.

BRAGANÇA, F.C.R. Considerações sobre o histórico dos medicamentos e plantas medicinais. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói, RJ, Editora da UFF, 1996.

CHIDAMBARA, M. K. N.; VANITHA, A.; MAHADEVA, S. M.; RAVISHANKAR, G. A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L. **Journal of Medicinal Food**, 6 (2), 99-105, 2003.

Correa, M.P., 1926. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Imprensa Nacional; Rio de Janeiro, Vol. IV, p 130.

D'AMBROSIO, N.; SCHINDLER, C.; VIRZO, S. A.; LICHTENTHALER, H. K. Carotenoid composition in green leaf and stem tissue of the CAM-plant *Cissus quinquangularis* Chiov. **Journal of Plant Physiology**, 143 (4-5), 508-513, 1994.

Di Carlo, G., 1999. Flavonoids: Old new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65: 337-353.

ELISABETSKY, E.; TEIXEIRA, K. M. C.; CARRERA, M. P.; MOURA, B. A. S.; MULLER, A. H. Ação anticonvulsivante de *Cissus sicyoides*, cipó-pucá. **Ciência e Cultura**, 40, p.985 (resumo), 1988.

FRITZEMEIER, K. H.; KINDL, H. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. **Planta**, 151 (1), 48-52, 1981.

GARCIA, M. D.; QUILEZ, A. M; SAENZ, M. T; MARTINEZ-DOMINGUEZ, M. E.; DE LA PUERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **J.**



**Ethnopharmacol.**, 71 (3), 395-400, 2000.

GARCIA, X.; CARTAS-HEREDIA, L.; LORENZANA-JIMENEZ, M.; GIJON, E. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on guinea-pig aortic rings. **General Pharmacology**, 29 (3), 457-462, 1997.

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Modified distillation trap., **Chemist Analyst**, 49, p. 114, 1960.

GUPTA, M., M.; VERMA, R., K. Unsymmetric tetracyclic triterpenoid from *Cissus quadrangularis*. **Phytochemistry**, 29 (1), 336-337, 1990.

GUPTA, M. M.; VERMA, R. K. Lipid constituents of *Cissus quadrangularis*. **Phytochemistry**, 30 (3), 875-878, 1991.

IVORRA, M. D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **J. Ethnopharmacol.**, 27, 243-275, 1989.

JAINU, M.; DEVI, C. S. S. Gastroprotective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. **Chemico-Biological Interactions**, 161 (3), 262-270, 2006.

JAINU, M.; DEVI, C. S. S. Effect of *Cissus quadrangularis* on gastric mucosal defensive factors in experimentally induced gastric ulcer-a comparative study with sucralfate. **Journal of Medicinal Food**, 7 (3), 372-376, 2004.

JAINU, M.; MOHAN, K. V.; DEVI, C. S. S. Protective effect of *Cissus quadrangularis* on neutrophil mediated tissue injury induced by aspirin in rats. **J. Ethnopharmacol.**, 104 (3), 302-305, 2006.

JAINU, M.; SHYAMALA, D.; CHENNAM, S. Attenuation of neutrophil infiltration and proinflammatory cytokines by *Cissus quadrangularis*: a possible prevention against gastric ulcerogenesis. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, 5 (3), 33-42,

2005.

JAINU, M.; VIJAI, M. K.; SHYAMALA, D. C S. Gastroprotective effect of *Cissus quadrangularis* extract in rats with experimentally induced ulcer. **The Indian Journal of Medical Research**, 123 (6), 799-806, 2006.

JOLY, A. B. Introdução à taxonomia vegetal. 12 ed. Nacional, 1998, 777 p.

KHAN, M. A.; NABI, S. G.; PRAKASH, S.; ZAMAN, A. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. **Phytochemistry**, 25 (8), 1945-1948, 1986.

LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M.; PÈREZ, O. C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco-ubi) **Revista Cubana de Farmacología**, 34,120-124, 2000.

LOMBARDI, J.A. Two notable new species of *Cissus* (Vitaceae) from South America. **Britonia**, 50, (1), 19-22, 2000.

Lorenzi, H. & Matos, F.J.A. 2002. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 512p.

Macari, P.A.T, Emerenciano, V.P, Ferreira, Z.M.G.S. Identificacao dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana atraves de analise por microcomputador. **Quimica Nova** 13: 260-262, 1990.

MEHTA, M.; KAUR, N.; BHUTANI, K. K. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* Linn. and their quantitation by HPTLC and HPLC. **Phytochemical Analysis**, 12 (2), 91-95, 2001.

Morton J. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Springfield III. Charles Thomas Publ. EE.UU, 1981.

MOURA, B. A. S. Estudo químico e farmacológico de espécie vegetal *Cissus*

*sycioides* Linn. Apostila do curso de especialização em química de produtos naturais da Universidade do Pará, Belém, p. 98, 1986.

NICOLSON, D. H.; JARVIS, C. *Cissus verticillata*, a new combination for *Cissus sicyoides* (Vitaceae). **Taxon**, 33, 726-727, 1984.

PEPATO, M. T., KELLER, E. H., SILVA, M. P. M., BAVIERA, A. M. Efeito da administração crônica de *Cissus sicyoides* no metabolismo dos carboidratos. In: Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais, Águas de Lindóia, SP, p.78, 1998.

PEPATO, M. T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUT, I C. Brunetti Iguatemy Lourenço *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 37 (Pt 1), 15-20, 2003.

POUCHERT, C. J., BEHNKE, J. The Aldrich Library of <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H FT NMR Spectra, Ed. 1, Vol. 2., United States, Aldrich Chemical Company, Inc., p. 170, 1993.

PRASAD, G. C.; CHATTERJEE, S.; UDUPA, K. N. Effect of phytogetic steroid of *Cissus quadrangularis* on endocrine glands after fracture. **Journal of Research in Indian Medicine**, 4 (2), 132-142, 1970.

QUILEZ, A. M.; SAENS, M. T.; GARCIA, M. D.; LA PUERTA, R. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. And *Cissus sicyoides* L. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 9, 1185-1189, 2004.

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.* Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: Inpa, 1999, 816 p.

SAENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; QUILEZ, A.; AHUMADA, M. C. Cytotoxic activity of *Agave intermixtya* L.(Agavaceae) and *Cissus sycioides* L. (Vitaceae). **Phytother. Res.**, 14, 552-554, 2000.

SAIFAH, E. Phytochemical investigation of a *Thai indigenous* plant, *Cissus rheifolia* Planch. 1981, 159 pp.

SAIFAH, E.; KELLEY, C. J.; LEARY, J. D. Constituents of the leaves of *Cissus rheifolia*. **J. Nat. Prod.**, 46 (3), 353-358, 1983.

SAIFAH, E.; VAISIROJ, V.; KELLEY, CHARLES J.; HIGUCHI, YOSHIHIRO. Constituents of the roots of *Cissus rheifolia*. **J. Nat. Prod.**, 50 (2), 328, 1987.

SALES, T. P.; LINO, C. S.; MAGALHÃES, J. F.; OLIVEIRA, F. S. A.; BASTOS, V. R., SILVEIRA, E. R.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da fração semi-purificada de *Cissus Sicyoides*. I Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais (SBPM/NE), Fortaleza-CE. In Livro de Resumos, 2005.

SEN, S. P. Active constituents (oxo steroids) of *Cissus quadrangularis*. **Indian Journal of Pharmacy**, 26 (9), 247-248, 1964.

SEN, S. P. Studies on the active constituents of *Cissus quadrangularis*. II. **Current Science**, 35 (12), 317, 1966.

SHIRWAIKAR, A.; KHAN, S.; MALINI, S. Antiosteoporotic effect of ethanol extract of *Cissus quadrangularis* Linn. on ovariectomized rat. **J. Ethnopharmacol.**, 89 (2-3), 245-250, 2003.

SILVA, G. A. Caracterização e padronização farmacológica da droga e extrato fluido de *Cissus sycioides* L. São Paulo: Universidade Estadual de São Paulo, 82 p. (Tese de Mestrado), 1995.

TING, I. P.; STERNBERG, L. O.; DENIRO, M. J. Variable photosynthetic metabolism in leaves and stems of *Cissus quadrangularis* L. **Plant Physiology**, 71 (3), 677-679, 1983.

TOLEDO, M. C. F.; REYES, F. G. R.; IADEROZA, M.; FRANCIS, F. J.; DRAETTA, I. S. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides*, Linn.). **Journal of Food Science**, 48 (4), 1368-1369, 1983.

TRINDER, P. Determination of glucose using glucose oxidase with and alternative oxygen acceptor. **Ann. Clin. Biochem.**, V. 6, P. 24-27, 1969.

VIANA, G. S. B. ; MEDEIROS, A. C. C. ; LACERDA, A. M. R. ; LEAL, L. K. A. M. ; VALE, T. G. ; MATOS, F. J. A. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, 4 ,1-7, 2004.

VIRZO DE SANTO, A.; ALFANI, A.; GRECO, L.; FIORETTO, A. Environmental influences on CAM activity of *Cissus quadrangularis*. **Journal of Experimental Botany**, 31 (120), 75-82, 1980.

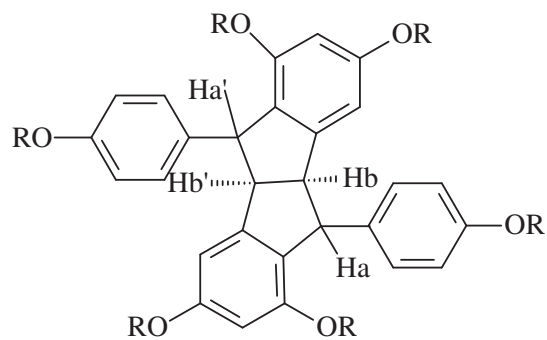
VISENTIN, V. ; MARQ, P. ; BOUR, S. *et al.* Effect of prolonged treatment with tyramine on glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, 59, 225-232, 2003.

VISENTIN, V., BOUR, S., BOUCHER, J. *et al.* Glicose handling in streptozotocin-induced diabetic rats is improved by tyramine but not the amine oxidase inhibitor semicarbazide. **European Journal of Pharmacology**, 522, 139-146, 2005.

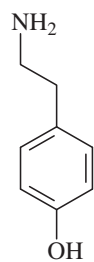
YANG, L.; WANG, F. Extraction of stilbene derivatives from *Cissus assamica* as endothelin antagonists. **Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu**, 12 pp. ,1998.

ZORZANO, O. *et al.* Combination of amines and vanadium(IV)/(V) compounds for the treatment and/or prevention of diabetes mellitus. Universidad de Barcelona, Spain. PCT Int. Appl. 2002, 35 pp.

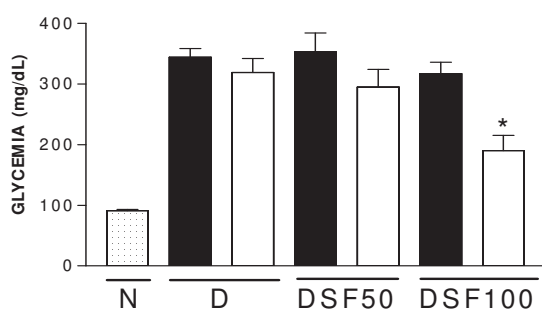
# Anexos



R = H; Ar(eq); H<sub>A,A'</sub>(ax) **Palidol**



**Tiramina**



## Anti-Diabetic Activity of a Fraction from *Cissus verticillata* and Tyramine, its Main Bioactive Constituent, in Alloxan-Induced Diabetic Rats

<sup>1</sup>Cleide de Sousa Lino, <sup>1</sup>Thiago de Paiva Sales, <sup>1</sup>Patrícia Bezerra Gomes, <sup>1</sup>Jeferson Falcão do Amaral, <sup>2</sup>Francisco S. Oliveira Alexandre, <sup>2</sup>Edilberto R. Silveira, <sup>3</sup>Jamile M. Ferreira, <sup>3</sup>Daniel Freire de Sousa, <sup>3</sup>Maria Goreti Rodrigues de Queiroz, <sup>1</sup>Francisca Cléa Florenço de Sousa, <sup>4</sup>Gerly Anne de Castro Brito, <sup>5</sup>Salete Maria da Rocha Cipriano Brito and <sup>1</sup>Glauce Socorro de Barros Viana

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology,

<sup>2</sup>Department of Organic Chemistry,

<sup>3</sup>Department of Clinical and Toxicological Analyses,

<sup>4</sup>Department of Morphology, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1127, CEP 60430-270, Fortaleza, Brazil

<sup>5</sup>Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

**Abstract:** *Cissus verticillata* (syn. *C. sycioides*, fam. Vitaceae) is a medicinal plant popularly used in Brazil, for the treatment of *diabetes mellitus*. The anti-diabetic activity of a fraction from leaves of *Cissus verticillata* (MSF, methanol soluble fraction), as well as that of tyramine (TYR) were investigated, in the model of alloxan-induced diabetes, in male Wistar rats. The biochemical parameters studied were: serum glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and very low density lipoprotein (VLDL), urea, creatinine, AST and ALT levels. Besides, glycated hemoglobin and liver glycogen concentrations were also determined. The MSF (50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.), tyramine (1 and 2 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.), glibenclamide (GLI 5 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) and metformin (MET, 50 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) were administered daily, for 5 days, 48 h after the alloxan injection (40 mg kg<sup>-1</sup>, i.v.). Drugs were administered alone or associated. Alloxan-diabetic rats showed significant reductions in plasma glucose, triglycerides and total cholesterol, after the treatment with the MSF, tyramine and glibenclamide, as compared to diabetic controls. The MSF and TYR effects were not potentiated by their association with GLI. Besides, MSF or TYR did not reverse DZ-induced hyperglycemia. However, MSF and TYR effects were significantly potentiated by MET, suggesting that these drugs act by a mechanism similar to that of MET. The other biochemical parameters were unaltered. The treatment of diabetic animals with the MSF increased the number of pancreatic beta cells. TYR also decreased the concentration of glycated Hb. While a 61% decrease in glycogen concentration was observed in diabetic controls, a total and partial recoveries of alloxan effects were seen after treatment of diabetic animals with the MSF (100 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) and measurements carried out 2 and 24 h after amyloglicosidase addition, respectively. In conclusion, our results showed that the MSF and TYR, when administered by gavage for 5 days, may reduce glucose, TG and TC levels by a mechanism at least in part similar to that of MET. These results point to the insulin-like effects of *C. verticillata*, probably due to the presence of tyramine in the plant.

**Key words:** *C. verticillata*, glucose, triglycerides, total cholesterol, tyramine, anti-diabetic activity

### INTRODUCTION

*Diabetes mellitus* is a group of syndromes characterized by hyperglycemia, altered metabolism of lipids, carbohydrates and proteins and an increased risk of complications from vascular diseases<sup>[1]</sup>. Several

medicinal plants are popularly used in Brazil and elsewhere for the treatment of diabetes and among them are those belonging to the genus *Bauhinia*, *Momordica*, *Eugenia* and *Cissus*<sup>[2,3,4]</sup>.

*Cissus verticillata* syn. *C. sycioides* (Vitaceae), species studied in the present research, is a medicinal plant

**Corresponding Author:** Glauce Socorro de Barros Viana, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel. Nunes de Melo, 1127 60.430-270 Fortaleza Brazil

popularly known in Brazil as cipó-pucá, anil-trepador, cortina, or insulina<sup>[4,5,6]</sup>. Leaf decoctions from *C. verticillata*, called elsewhere as *princess vine*, are taken as a popular remedy for diabetes in Brazil, where it is also known as vegetal insulin, as well as for other diseases, including rheumatism, epilepsy and stroke<sup>[7]</sup>.

Analgesic and anti-inflammatory effects were detected in *C. quadrangularis*<sup>[8]</sup> (Panthong *et al.*, 2006), while analgesic activity was also observed by us in the aqueous extract and methanol soluble fraction prepared from the fresh leaves of *Cissus verticillata*<sup>[9,10]</sup>. Furthermore, a very recent study<sup>[11]</sup> reported that the methanol extract of *C. quadrangularis* possesses peripheral as well as central analgesic effects.

Several substances were isolated from the genus *Cissus*. Thus, Beltrame reported the isolation of a new coumarin glycoside in the aerial parts of *C. verticillata*, together with a known coumarin, two flavonoids and two steroids<sup>[6,12]</sup>. Furthermore, luteonin, kaempferol and luteonin-3-sulphate were also isolated from the aqueous extract after acid hydrolysis<sup>[13]</sup>.

Recently, tyramine was isolated as a new substance from *C. verticillata*, at the Organic Chemistry Laboratory of the Federal University of Ceará (Brazil)<sup>[14]</sup>. Many studies have found that tyramine administration to diabetic rats increases glucose disposal and reduces hyperglycemia, an effect occurring even at doses that have little effect on cardiovascular variables and for this reason it has been suggested as a possible treatment for diabetes<sup>[15,16]</sup>.

There are only a few reports on the effects of *C. verticillata* and their constituents<sup>[6,7,12,13]</sup> in the literature, some of them presenting contradictory or unsuccessful results<sup>[12]</sup>. In a previous study<sup>[17]</sup>, we showed that a semi-purified fraction from *C. verticillata* presents hypoglycemic and hypolipidemic activities, in the model of alloxan-induced diabetes in rats. In the present study, we further investigate the effects of the daily oral treatment for 5 days of alloxan-diabetic rats, with a methanol soluble fraction from *C. verticillata* leaves, as compared to its main active constituent, tyramine, on the serum glucose as well as on other biochemical parameters. The effects of the drugs on pancreatic beta cells and on glycated HB levels as well as on hepatic glycogen contents were also investigated, attempting to clarify the mechanism of the hypoglycemic action of this medicinal species.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant:** Fresh leaves of *Cissus verticillata* were harvested from the Prof. Francisco José de Abreu Matos Medicinal Plants Garden, at the Federal

University of Ceará. Voucher specimens (No.32240), identified at Kew Garden, UK, are deposited at the Prisco Bezerra Herbarium, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

**Methanol soluble fraction preparation (MSF):** A three hundred gram aliquot of fresh leaves from *Cissus verticillata* was submitted to decoction with 500 mL (twice) of H<sub>2</sub>O, for 5 min. The procedure was repeated three more times to yield a 4 L solution, from a total of 1.2 kg of leaves. After lyophilization, 29.5 g of a light brown solid residue was obtained, which in turn was stirred for 30 min with 50 mL of methanol (twice) to afford 15.67 g of a viscous brown residue, after methanol rotoevaporation (MSF) and 11.35 g of the methanol insoluble residue (MIR). Among all the fractions tested for anti-diabetic activity, the most active one was the MSF and, for this reason, it was chosen for further analyses.

**Isolation of tyramine (present in *C. verticillata* leaves) from the MSF:** MSF (5.1 g) dissolved in MeOH and submitted to gel permeation over Sephadex LH-20 (100 g) on a 500 mL glass column (5 cm diameter), by elution with MeOH, resulted in 24 fractions (9 mL each), followed by two larger fractions (125 and 250 mL) and finally by a 500 mL fraction eluted with MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1. After TLC comparison, three major fractions were obtained by pooling the similar fractions: CvMsF<sub>8-12</sub> (1.23 g), CvMsF<sub>13-18</sub> (1.54 g) and CvMsF<sub>19-24</sub> (1.01 g). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD) analysis of all major fractions revealed the presence of a major compound in F<sub>19-24</sub> that was later designated (tyramine rich fraction (TRF). Besides tyramine characteristic pair of doublets in the aromatic region (6.77 and 7.10 ppm, J 8.4 Hz) and the pair of triplets in the aliphatic region (2.87 and 3.12 ppm), several signals between 3.3 and 4.3 ppm followed by doublets at 4.5 and 5.1 ppm were indicative of the presence of sugar components. TRF was rechromatographed on Sephadex LH-20 by elution with MeOH to yield 12 fractions (9 mL each) that were compared by TLC and pooled by similarity. F<sub>6-8</sub> (750 mg) was redissolved in MeOH and, then, EtOAc was added dropwise until the formation of a light yellow precipitate. Filtration afforded 390 mg of tyramine (2-*p*-hydroxyphenylethylamine) identical to the standard tyramine, after TLC co-chromatography and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral analyses (157.8, 116.9, 130.9, 128.6, 42.4 and 33.9 ppm). These methods were performed either separately with tyramine from TRF and standard tyramine, or in a 1:1 mixture. The process was repeated 4 times in order to provide enough material for all pharmacological assays.



**Drugs:** Alloxan monohydrate, tyramine hydrochloride and diazoxide were obtained from Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA), glibenclamide, from Aventis Brasileiro Ltda. (GO, Brazil) and metformin, from Merck. All other drugs were of analytical grade and dissolved in distilled water for oral administration, before use.

**Animals:** Male Wistar rats (180-250 g) from the Animal House of the Federal University of Ceará were housed in standard environmental conditions ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ , humidity  $60\pm 5\%$ , 12 h light: 12 h dark cycle), with free access to a standard commercial diet and water *ad libitum*. Experiments were performed according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, from the US Department of Health and Human Services, Institute of Laboratory Animal Resources, Washington DC, 1985. Experimental protocol: Animals were divided into 8 groups of 5-38 animals each. The first group, untreated, was named the normal group (NC). Diabetic groups (untreated and treated) fasted for at least 16 h, received alloxan (ALX,  $40\text{ mg kg}^{-1}$ ) through the penile vein. The diabetic state in these groups was assessed by measurements of the serum glucose levels, 48 h later, when around 40% deaths were registered due to the alloxan toxicity. Animals that presented glucose levels lower than  $200\text{ mg dL}^{-1}$  were rejected. The studied groups were: normal (NC), diabetic plus distilled water (DC), diabetic plus methanol soluble fraction, 50 and  $100\text{ mg kg}^{-1}$  (MSF 50 and MSF 100), diabetic plus glibenclamide  $5\text{ mg kg}^{-1}$  (GLI 5), diabetic plus standard tyramine 1 and  $2\text{ mg kg}^{-1}$  (TYR 1 or 2) and diabetic plus glibenclamide  $5\text{ mg kg}^{-1}$  (GLI 5) alone or associated with tyramine. Besides, other diabetic rat group treated with metformin  $50\text{ mg kg}^{-1}$  (MET) alone or associated with tyramine were also included. Animals were treated orally for 5 days (unless otherwise specified), 48 h after the alloxan-induced diabetes. Blood samples were collected just prior and five days after treatments.

**Determination of biochemical parameters in rat serum:** Blood from the retro-orbital plexus was collected and centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the glucose level was determined by the glucose oxidase-peroxidase enzymatic method (Labtest, Brazil). Concentrations of serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and very low density lipoprotein (VLDL) levels were measured by standard enzymatic colorimetric methods (Trinder 1969) in the spectrophotometer, model Selectra II, from Winner. AST, ALT, urea and creatinine levels were also

determined by standard procedures, according to the manufacturer's instructions (Labtest, Brazil).

**Effects of the MSF, TYR, GLI and diazoxide (DZ), alone or associated, on DZ-induced hyperglycemia:** Groups of 6 male Wistar rats (150-250 g) were divided into normal controls (NC), MSF ( $100\text{ mg/kg}$ ), GLI ( $5\text{ mg/kg}$ ), TYR ( $2\text{ mg kg}^{-1}$ ), DZ ( $60\text{ mg kg}^{-1}$ ) and the associations of MSF 100+DZ 60, GLI 5+DZ 60, TYR 2+DZ 60. Firstly, animals were treated orally with each drug and their blood collected before and 30, 60 and 120 min after the drugs administration. In another experiment, animals were treated with the drugs and injected with DZ, 30 min later. Blood samples were collected from the retro-orbital plexus, in tubes containing separation gel, before and 30, 60 and 120 min after DZ administration. Then, the blood was centrifuged at 3,000 rpm, for 10 min and samples used for glucose determination by the glucose-oxidase method (Labtest, Brazil).

**In vitro determination of glycated hemoglobin (Hb):** Blood was collected from the abdominal aorta of non-diabetic 12 h fasted rats and distributed in tubes containing EDTA ( $10\text{ g dL}^{-1}$ ). After centrifugation at 3,000 rpm, the supernatant was discarded and cells, filtered, washed ( $0.15\text{ M NaCl}$ , 1:10, 3×times) and centrifuged at 3,000 rpm, 5 min each time. The cell suspension was washed twice more, transferred to tubes and phosphate buffer  $0.01\text{ M}$ , pH 7.4, containing gentamycin ( $20\text{ mg dL}^{-1}$ ) and CCl<sub>4</sub> (1:2:0.5) was added. The mixture was centrifuged at 3,000 rpm, 5 min and the total Hb concentration in the supernatant, determined spectrophotometrically at 540 nm. The mixture was diluted in  $0.01\text{ M}$  phosphate buffer, pH 7.4, to obtain a solution containing  $8\text{ g dL}^{-1}$  of Hb. Tubes with the hemoglobin solution (final concentration of  $4\text{ g dL}^{-1}$ ), gentamycin ( $20\text{ mg dL}^{-1}$ ) and 1 mL of phosphate buffer, containing 50 mM glucose (controls), MSF, TYR or quercetin ( $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , each) were incubated for 48 h (in the dark and at room temperature). After incubation, samples were treated with 1 M boric acid to remove the unstable fraction of the glycated hemoglobin and submitted to ionic exchange chromatography for glycated hemoglobin determination.

**Hepatic glycogen determination:** Alloxan-induced diabetic rats were treated with MSF ( $100\text{ mg kg}^{-1}$ , p.o.) or distilled water (DC), for 10 days. Control animals (NC) were also treated with distilled water. In the 10th day, animals were anesthetized with ether, 1 h after the

last drug treatment, their livers dissected, washed with saline and samples from all groups were removed and weighted. Then, samples were homogenized in sodium citrate buffer (0.1 M, pH 4.2) and 10 µL of the homogenate was used to determine free glucose in the tissue. For this assay, 100 mg liver pieces in 10 mL buffer were used, followed by the addition to the homogenate of 1 mg of powder amyloglicosidase per ml of buffer. The assay mixture was left at room temperature, from 2-24 h. Samples (10 µL) were then used to determine the total glucose concentration, by the glucose oxidase method, according to the manufacturer's instructions (Labtest, Brazil). Results were expressed as mg glycogen/100 mg tissue.

**Histological studies:** Diabetic animals were sacrificed at the 5th day after treatment and their pancreas dissected, washed with saline and placed in buffered formalin, followed by a 70% alcohol solution, 24 h later. Tissue samples were fixed in formalin and embedded in paraffin for light microscopy examination of HE sections.

**Statistical analyses:** All results are presented as mean±S.E.M. Data was analyzed by ANOVA followed by Student-Neuman-Keuls as the *post hoc* test and Student's t-test for paired observations. Results were considered significant at  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

The treatment of diabetic rats with MSF, at the doses of 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, p.o., significantly decreased glycemia in 28 and 46%, respectively. While TC levels were unchanged, TG and VLDL levels also decreased by 44 and 54%, with both doses, as compared to values before the treatment. TYR 1 and GLI 5 (an oral hypoglycemic drug of the sulfonylurea class, used as standard) treatments of diabetic rats decreased levels of glycemia, TG and VLDL in 41 and 57% and in 45 and 54%, respectively, as compared to values before the treatment. While TYR 2 decreased levels of glycemia, TG and VLDL in 33 and 57%. A similar picture was observed after treatment of diabetic rats with the association of GLI 5 + TYR 1 (32 and 49% decreases of glycemia and TG levels, as compared to values before the treatment) (Table 1 and 2).

Although diabetic rats showed a 28% increase in urea values, these values came close to normal ones, 5 days later. However, the increase in creatinine levels was maintained after this period of time (3.6 and 3 times increases, respectively). Urea values in diabetic rats before treatment with MSF (50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>,

Table 1: Glycemia and serum lipid profiles (mg dL<sup>-1</sup>) in normal controls (NC), alloxan-induced diabetic rats (DC) and diabetic rats, before and after treatment with the methanol soluble fraction from *Cissus verticillata* (MSF), tyramine (TYR), glibenclamide (GLI) and the combination of glibenclamide plus tyramine (GLI + TYR)

| Groups<br>(mg kg <sup>-1</sup> , p.o) | Glycemia (mg dL <sup>-1</sup> ) |                |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------------|
|                                       | Before                          | After          |
| NC                                    | 93.9±2.70 (10)                  | 97.8±4.55      |
| DC                                    | 377.6±14.11 (38)*               | 369.3±19.34*   |
| MSF 50                                | 410.7±32.29 (20)*               | 295.5±26.04**  |
| MSF 100                               | 354.7±21.29 (22)*               | 191.7±19.71**  |
| TYR 1                                 | 373.5±27.15 (13)*               | 219.9±14.25**  |
| TYR 2                                 | 257.3±22.96 (07)*               | 171.9±26.33**  |
| GLI 5                                 | 385.4±17.63 (12)*               | 210.3± 30.67** |
| GLI 5+TYR 1                           | 374.6±20.34 (07)*               | 256.1± 33.31** |

Values represent mean±SEM for the number of animals in parentheses. Diabetic rats were treated with distilled water (DC) or MSF (50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>), TYR (1 and 2 mg kg<sup>-1</sup>), GLI (5 mg kg<sup>-1</sup>) or the association of GLI (5 mg kg<sup>-1</sup>) plus TYR (1 mg kg<sup>-1</sup>), orally for 5 days. Before and After = diabetic animals before and after treatment.\* $p < 0.05$  as compared to normal controls (NC). The data were analyzed by ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test.\*\* $p < 0.01$  when compared to the same group before treatment (Student's paired t test)

p.o.) increased in 80 and 134% and decreased to 16 and 25% after treatment. Similar data were observed in creatinine levels which decreased from 2.6-1.2 times and from 1.9 times to normal ones, after diabetic rats treatment with the MSF doses of 50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. While TYR 1 and TYR 2 treatments of diabetic rats did not significantly altered urea levels, they decreased creatinine levels to 1.4 and 1.5 times, as related to normal controls. As far as AST and ALT levels are concerned, the only significant change was that seen with the group of diabetic animals treated with the association of GLI 5+TYR 1 where decreases of 48 and 22% respectively were observed, as compared to diabetic controls (Table 3).

Diazoxide (DZ) is an antihypertensive drug that increases blood glucose by decreasing insulin release levels and opening of K<sup>+</sup> channels and, in this sense, it presents a mechanism of action opposed to that of GLI. Our data (Table 4) showed that DZ significantly increased glycemia, after 60 and 120 min. MSF or TYR alone did not alter the blood glucose levels during this period (up to 120 min) nor reversed the DZ hyperglycemic effect. On the other hand, while GLI did not show any effect *per se*, it significantly reversed the hyperglycemic effect of DZ, bringing values to normal levels. These experiments showed that both the MSF and TYR probably do not act by the same mechanism as GLI. In order to clarify the mechanism of action of the hypoglycemic effect of *C. verticillata*, biochemical parameters in sera of diabetic rats treated with

Table 2: Total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and very low density lipoprotein (VLDL) levels in the serum from normal (NC) and alloxan-induced diabetic rats (DC), before and after the treatment with the methanol soluble fraction from *Cissus verticillata* (MSF), tyramine (TYR), glibenclamide (GLI) and the combination of glibenclamide plus tyramine (GLI + TYR)

| Group         | TC                 |             | TG                   |               | VLDL (mg dL <sup>-1</sup> ) |             |
|---------------|--------------------|-------------|----------------------|---------------|-----------------------------|-------------|
|               | Before             | After       | Before               | After         | Before                      | After       |
| NC            | 64.1±5.38<br>(10)  | 58.7±3.93   | 64.9±9.17<br>(12)    | 79.8±10.25    | 12.8±1.74<br>(12)           | 16.0±2.05   |
| DC            | 78.2±4.99<br>(20)* | 62.5±3.53   | 184.2±13.51<br>(31)* | 145.0±12.9*   | 36.8±2.70<br>(31)*          | 28.8±2.64*  |
| MSF 50        | 74.4±4.61<br>(19)* | 60.2±3.82** | 177.0±17.47<br>(13)* | 99.5±5.97**   | 35.4±3.49<br>(13)*          | 19.9±1.19** |
| MSF 100       | 64.4±2.80<br>(9)   | 53.3±3.89** | 152.4±17.76<br>(29)* | 70.5±4.67**   | 30.5±3.55<br>(29)*          | 14.1±0.93** |
| TYR 1         | 68.4±5.65<br>(14)  | 60.3±7.23   | 228.8±16.78<br>(19)* | 98.8±8.96**   | 45.8±3.40<br>(19)*          | 19.8±1.79** |
| TYR 2         | 53.3±2.63<br>(12)  | 43.9±1.36** | 149.4±11.86<br>(10)* | 64.2±6.50**   | 29.9±2.38<br>(10)*          | 12.8±1.30** |
| GLI 5         | 76.9±8.08<br>(15)* | 53.2±4.70** | 167.7±20.15<br>(16)* | 76.9±9.70**   | 33.5±4.03<br>(16)*          | 15.4±1.96** |
| GLI 5 + TYR 1 | 81.5±5.09<br>(18)* | 67.8±4.63** | 262.5±28.13<br>(6)*  | 134.0±24.60** | 52.3±5.54<br>(6)*           | 26.8±4.92** |

TC, TG e VLDL were measured in the serum from NC, DC and diabetic rats, before and after oral treatments for 5 days with MSF (50 and 100 mg), TYR (1 and 2 mg) and GLI (5 mg/kg), alone or associated. Treatments started 48 h after alloxan-induced diabetes. NC and DC were treated with distilled water. Values represent mean±SEM of the number of animals in parenthesis. \*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test), \*\*p<0.05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t test)

Table 3: Urea, creatinine, AST and ALT levels in the serum of normal controls, alloxan-induced diabetic rats and diabetic rats, before and after treatment with the methanol soluble fraction from *Cissus verticillata* (MSF), tyramine (TYR), glibenclamide (GLI) and the combination of glibenclamide plus tyramine (GLI + TYR)

| Group       |   | Urea (mg DL <sup>-1</sup> ) | Creatinine (mg dL <sup>-1</sup> ) | AST (U L <sup>-1</sup> ) | ALT (U L <sup>-1</sup> ) |
|-------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| NC          | B | 38.8±2.32<br>(14)           | 0.8±0.03<br>(14)                  | 97.6±6.23<br>(10)        | 57.4±4.02<br>(12)        |
|             | A | 38.0±2.26                   | 0.8±0.03                          | 87.7±6.54                | 51.3±4.95                |
| DC          | B | 53.7±4.03<br>(15)*          | 2.9±0.19<br>(15)*                 | 126.8±8.43<br>(26)       | 58.7±5.52<br>(21)        |
|             | A | 45.4±5.07                   | 2.4±0.10*                         | 118.0±8.25               | 58.7±7.25                |
| MSF 50      | B | 70.0±9.03<br>(8)*           | 2.1±0.46<br>(8)*                  | 112.5±7.32<br>(13)       | 48.0±3.86<br>(11)        |
|             | A | 59.0±6.06**                 | 1.0±0.14**                        | 92.1±7.50**              | 55.5±5.35                |
| MSF 100     | B | 90.8±7.18<br>(8)*           | 1.5±0.27<br>(8)*                  | 127.8±8.26<br>(16)       | 54.0±5.08<br>(13)        |
|             | A | 67.8±6.40**                 | 0.9±0.13**                        | 119.8±8.89               | 49.4±5.75                |
| TYR 1       | B | 46.5±4.40<br>(10)*          | 2.5±0.21<br>(13)*                 | 104.1±8.72<br>(21)       | 46.0±3.15<br>(21)        |
|             | A | 33.6±5.13**                 | 1.8±0.17**                        | 88.3±10.02               | 38.0±2.82                |
| TYR 2       | B | 63.4±3.73<br>(10)*          | 1.8±0.29<br>(10)*                 | 122.9±12.1<br>(12)       | 52.3±4.06<br>(12)        |
|             | A | 53.8±3.10                   | 1.2±0.15**                        | 113.7±12.31              | 45.3±4.41                |
| GLI 5       | B | 67.6±6.55<br>(10)*          | 1.4±0.15<br>(8)                   | 125.3±9.25<br>(8)        | 53.7±5.52<br>(8)         |
|             | A | 60.9±3.60                   | 1.0±0.07**                        | 111.8±6.91               | 48.4±5.96                |
| GLI 5+TYR 1 | B | 90.5±5.88<br>(12)*          | 1.5±0.20<br>(8)*                  | 91.3±6.99<br>(8)         | 37.3±2.07<br>(8)         |
|             | A | 92.1±8.83                   | 0.9±0.04**                        | 47.3±4.60*,**            | 29.0±0.90**              |

Values represent mean±SEM for the number of animals in parentheses. NC = non-diabetic controls. Diabetic animals were treated, orally for 5 days, with distilled water (DC) or MSF (50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>), TYR (1 and 2 mg kg<sup>-1</sup>) and GLI (5 mg kg<sup>-1</sup>), alone or associated. B and A = diabetic animals before and after treatments. \*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test); \*\*p<0.05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t test)

tyramine, metformin (an oral hypoglycemic drug of the biguanide class) and their association were determined. We showed that TYR (1 and 2 mg Kg<sup>-1</sup>, p.o.) decreased in a dose-dependent manner (35 and 43% decreases,

respectively) glycemia values, as compared to diabetic controls, while metformin caused a 49% decrease. The association MET 50+TYR 2 decreased the glycemia in 73% and MET 50 + TYR 1 brought glycemia values to

Table 4: Evaluation of the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, diazoxide (DZ), tyramine (TYR), glibenclamide (GLI) and the associations of MSF + DZ, TYR + DZ and GLI + DZ, on diazoxide glycemic curves, in rats

| Group         | Time (min) 0 | 30          | 60           | 120           |
|---------------|--------------|-------------|--------------|---------------|
| NC            | 88.5±2.55    | 91.0±3.72   | 98.3±6.64    | 99.0±5.36     |
| DZ 60         | 63.4±3.27    | 116.2±5.24  | 164.2±17.01* | 211.2±16.90*  |
| MSF 100       | 67.3±1.78    | 85.8±4.18   | 86.5±3.69    | 102.7±5.32    |
| MSF 100+DZ 60 | 55.7±1.80    | 112.2±6.02  | 147.3±4.29*  | 203.3±9.60*   |
| TYR 2         | 107.0±3.30   | 88.5±3.40   | 109.2±5.50   | 115.5±4.37    |
| TYR 2+DZ 60   | 62.2±3.63    | 117.0±6.57  | 166.1±21.1*  | 221.7±35.42*  |
| GLI 5         | 67.3±3.16    | 65.8±5.06   | 60.7±5.54    | 70.5±6.41     |
| GLI 5+DZ 60   | 76.0±3.73    | 74.0±7.75** | 99.0±9.79**  | 110.0±14.43** |

Values represent mean±SEM from 6 rats per group, fasted for 12 h. NC = normal controls. Glycemia was evaluated before (zero time, T=0). Then, animals were pretreated orally with MSF (100 mg kg<sup>-1</sup>), TYR (2mg kg<sup>-1</sup>) and GLI (5 mg kg<sup>-1</sup>) and 30 min later with DZ (60 mg kg<sup>-1</sup>, i.p.). Glycemia was measured at 30, 60 and 120 min after the administration of the drugs, alone or associated with DZ.\*p<0.05 as related to normal controls (NC), at each observation time,\*\*p<0.05 associated drugs as compared to DZ (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test)

Table 5: Effects of tyramine (TYR), the main active constituent of the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, alone or associated with metformin (MET), on glycemia, in alloxan-induced diabetic rats

| Group         | Glycemia (mg dl <sup>-1</sup> ) |                 |
|---------------|---------------------------------|-----------------|
|               | Before treatment                | After treatment |
| NC            | 72.9±2.30(08)                   | 80.8±3.37       |
| DC            | 328.2±22.02 (18)*               | 335.1±18.87*    |
| TYR           | 1 324.7±18.12 (17)*             | 211.3±15.23**   |
| TYR           | 2 259.5±17.57 (11)*             | 148.0±28.55**   |
| MET           | 50 315.6±18.70 (14)*            | 160.6±23.82**   |
| MET 50+TYR 1  | 308.0±24.03 (08)*               | 105.9±17.12**   |
| MET 50+ TYR 2 | 409.8±27.92 (08)*               | 111.3±27.93**   |

Values represent mean±SEM for the number of animals in parentheses. NC = normal controls. Diabetic animals were treated, orally for 5 days, with distilled water (DC), MET (50 mg kg<sup>-1</sup>), or TYR (1 and 2 mg kg<sup>-1</sup>), alone or associated. Before and After = diabetic animals before and after treatments.\*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test),\*\*p<0.05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t test)

normal ones, suggesting a potentiation of the TYR effect by MET 50 (Table 5).

Alloxan-induced diabetes *per se* did not significantly alter total cholesterol levels. The treatment of diabetic animals with TYR (1 and 2 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) or MET decreased cholesterol values which ranged from 23, 28 to 37%, as compared to values before the treatment. The association of TYR at the lower dose with MET decreased those values even more (34 and 26% decrease), as compared to values before the treatment. However, alloxan-induced diabetes increased drastically triglycerides levels (2.2-1.3 times). While these values after 5 days were still high, the treatment with TYR alone or associated with MET brought them closer to normal values. A similar picture was seen in VLDL levels that were drastically increased after diabetes induction and went down to normal values after treatment with TYR, MET and their association. VLDL values in diabetic rats without treatment (DC) were still high after 5 days (Table 6).

Alloxan-induced diabetes significantly increased urea as well as creatinine levels (153-101% and 7.8-6.3 times, respectively) (Table 7). However, while creatinine levels in diabetic rats remained higher 5 days later (7.8 and 6.3 times higher), as compared to normal controls, these values were significantly reduced from 26, 39 and 52, after treatment with TYR 1 (before: 6.5; after: 4.8 times), TYR 2 (before: 5.8; after: 3.5 times) and MET 50 (before: 7.8 times; after: 3.8 times). Urea values in diabetic rats before treatment with TYR (1 and 2 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.) and MET 50 increased in 114, 200 and 96% and decreased to 26, 16 and 31% after treatment. The association (MET 50+TYR 1 and MET 50+TYR 2) decreased the urea levels in 50 and 43% and creatinine in 57 and 32% as compared with diabetic rats before treatment. AST and ALT values were not significantly altered by diabetes, at the conditions of the present work. However, AST values in almost all diabetic treated groups were reduced, 5 days later, to around half, as compared to diabetic control values. On the other hand, no significant alteration was noticed in ALT values (Table 7).

Figure 1 shows that the glycogen concentrations were maintained at the same levels when measured in the normal control group, 2 and 24 h after the amyloglicosidase addition. A 61% decrease in glycogen concentration was observed in the diabetic control group, as measured at both time points. Total or partial recoveries of alloxan effects were seen, after the treatment of diabetic animals with the MSF (100 mg kg<sup>-1</sup>, p.o.), when the glycogen concentration was measured, 2 and 24 h after amyloglicosidase addition.

Table 8 shows the results of the levels of glycated hemoglobin which were significantly decreased in rat erythrocytes, in the presence of MSF (37% decrease), TYR (40% decrease) and quercetin, used as a positive standard (51% decrease). Our data show a similar efficacy among the three drugs used. Alloxan is known to destroy liver beta cells. We showed that the islet total

Table 6: Total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and very low density lipoprotein (VLDL) levels, in the serum from normal (NC) and alloxan-induced diabetic rats (DC), before and after treatment with the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, tyramine (TYR), metformin (MET) and the combination of MET + TYR

| Group       | TC                |               | TG                   |              | VLDL (mg dL <sup>-1</sup> ) |             |
|-------------|-------------------|---------------|----------------------|--------------|-----------------------------|-------------|
|             | Before            | After         | Before               | After        | Before                      | After       |
| NC          | 61.7±3.27<br>(20) | 72.2±1.79     | 64.9±9.17<br>(12)    | 79.8±10.25   | 12.8±1.74                   | 16.0±2.05   |
| DC          | 71.0±3.05<br>(18) | 64.7±3.14**   | 140.8±11.89<br>(15)* | 106.0±9.33*  | 28.2±2.38<br>(15)*          | 21.2±1.87   |
| TYR 1       | 67.6±3.25<br>(15) | 52.3±4.17*,** | 181.4±14.44<br>(17)* | 89.4±8.77**  | 36.3±2.89<br>(17)*          | 17.9±1.75** |
| TYR 2       | 66.1±3.07<br>(11) | 47.3±1.69*,** | 154.0±11.70<br>(11)* | 70.6±10.62** | 30.8±2.34<br>(11)*          | 14.1±2.13** |
| MET 50      | 71.0±4.72<br>(14) | 44.5±2.84*,** | 152.8±15.11<br>(14)* | 79.7±5.62**  | 30.6±3.02<br>(14)*          | 16.0±1.12** |
| MET50+TYR 1 | 79.4±7.87<br>(8)* | 52.4±6.50***  | 166.8±14.13<br>(8)*  | 92.1±9.23**  | 33.4±2.83<br>(8)*           | 18.4±1.86** |
| MET50+TYR 2 | 63.7±3.98<br>(8)  | 47.3±2.34*,** | 209.3±13.38<br>(8)*  | 76.6±5.24**  | 41.9±2.68<br>(8)*           | 15.3±1.05** |

TC, TG and VLDL were measured in rat serum from NC, DC and diabetic rats before and after oral treatments for 5 days with tyramine (TYR 1 and 2 mg<sup>-1</sup> po) or Metformin (MET 50 mg kg<sup>-1</sup> po), alone or associated. Treatments started 48 h after alloxan-induced diabetes. Normal and diabetic controls were treated with distilled water. Values represent mean±SEM of the number of animals in parentheses. \*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test); \*\*p<0.05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t test)

Table 7: Urea, creatinine, AST and ALT levels in the serum of normal controls, alloxan-induced diabetic rats and diabetic rats before and after treatment with the tyramine (TYR), metformin (MET), or the combination of MET + TYR

| Group          |   | Urea (mg dL <sup>-1</sup> ) | Creatinine (mg dL <sup>-1</sup> ) | AST (U L <sup>-1</sup> ) | ALT (U L <sup>-1</sup> ) |
|----------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| NC             | B | 19.6±0.56<br>(12)           | 0.4±0.03<br>(14)                  | 86.0±4.04<br>(16)        | 49.2±4.32                |
| DC             | A | 21.1±0.88                   | 0.4±0.03                          | 70.4±2.75                | 48.9±4.24                |
|                | B | 49.7±3.44<br>(12)*          | 3.1±0.16<br>(12)*                 | 89.0±5.65<br>(24)        | 43.5±3.65<br>(10)        |
| TYR 1          | A | 42.6±6.27*                  | 2.5±0.10*                         | 73.2±7.94                | 52.9±4.84                |
|                | B | 42.0±4.74<br>(12)*          | 2.6±0.19<br>(13)*                 | 73.4±4.20<br>(14)        | 46.0±3.15<br>(21)        |
| TYR 2          | A | 31.0±4.60***                | 1.9±0.16**                        | 55.6±5.30**              | 38.0±2.82                |
|                | B | 59.0±2.07*<br>(6)           | 2.3±0.32<br>(06)*                 | 86.9±10.19<br>(8)        | 52.3±4.06<br>(12)        |
| MET 50         | A | 49.7±3.44*                  | 1.4±0.20**                        | 83.9±13.44               | 45.3±4.41                |
|                | B | 37.9±4.41*<br>(12)          | 3.1±0.14*<br>(16)                 | 74.8±5.34<br>(16)        | 40.0±1.97<br>(14)        |
| MET 50 + TYR 1 | A | 26.3±3.13**                 | 1.5±0.07**                        | 44.6±4.76*,**            | 33.2±1.91                |
|                | B | 51.8±1.81<br>(08)*          | 3.0±0.09*<br>(8)                  | 74.0±7.44<br>(11)        | 33.2±1.36<br>(11)        |
| MET 50 + TYR 2 | A | 26.0±2.05**                 | 1.3±0.12**                        | 48.2±3.73*,**            | 31.8±1.88                |
|                | B | 28.5±3.47<br>(08)*          | 3.1±0.24<br>(05)*                 | 78.8±9.05<br>(5)         | 34.8±2.19<br>(5)         |
|                | A | 16.3±3.24**                 | 2.1±0.27**                        | 40.0±3.15*,**            | 29.1±3.57*               |

Values represent mean±SEM for the number of animals in parentheses. NC = non-diabetic control animals. Diabetic animals were treated, orally for 5 days, with distilled water (DC) or tyramine (TYR 1 and 2 mg) and Metformin (MET 50 mg kg<sup>-1</sup>), alone or associated. B and A = diabetic animals before and after treatments. \*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test), \*\*p<0.05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t test)

area in the liver of diabetic rats was significantly decreased, as compared to normal controls and a similar picture was observed in diabetic rats treated with the lower dose of MSF. However, the treatment of diabetic rats with the higher MSF dose (100 mg kg<sup>-1</sup>) completely reversed the alloxan cytotoxicity and liver beta cells characteristics were not significantly different from the normal ones (Fig. 2).

The present work evaluated biochemical parameters, such as triglycerides, VLDL, cholesterol and glucose, in the serum of alloxan-induced diabetic rats, before and after the treatment with a semi-purified fraction from leaves of *C. verticillata* (methanol soluble fraction, MSF) and tyramine, a main bioactive constituent of this fraction. Our results showed that MSF significantly decreased serum glucose, total

Table 8: Hemoglobin (Hb, 4 g dL<sup>-1</sup>) *in vitro* glycation from nondiabetic rats, in the presence of D-glucose 50 mM and the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, as comparad to tyramine (TYR) and quercetine (QCT)

| Sample  | % HBA1c         | % Inibition |
|---------|-----------------|-------------|
| Control | 8.74±0.50 (05)  | -           |
| MSF     | 5.55±1.00 (04)* | 36.6        |
| TYR     | 5.21±0.89 (05)* | 40.4        |
| QCT     | 4.25±0.28 (04)* | 51.3        |

Blood from eight Wistar rats fasted for 12 h was collected from the abdominal aorta and used to prepare an erythrocyte pool (3 ml of blood from each animal). Then, samples of this hemoglobin solution were incubated, for determination of glycated hemoglobin *in vitro*. Control tubes contained only buffer, Hb (4 g dL<sup>-1</sup>) and D-glucose (50 mM). MSF, TYR and QCT were incubated at concentrations of 50 µg/ml. Values represent mean±SEM of the number of samples in parentheses. \*p<0.05 as related to controls (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test)

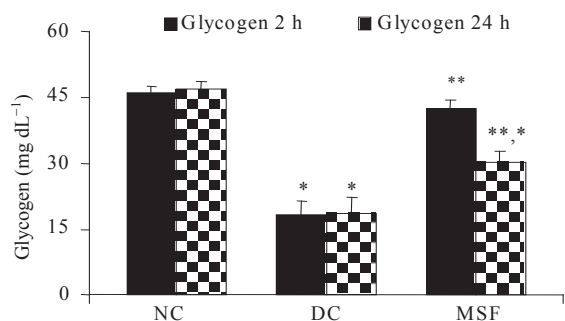


Fig. 1: Effect of the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, on hepatic glycogen, in diabetic rats. Values represent mean±SEM of ten animals. NC = non-diabetic controls treated only with distilled water. Diabetic animals were treated with distilled water (DC) or MSF (100 mg kg<sup>-1</sup>), orally for ten days and after treatments livers were dissected and glycogen contents determined, 2 and 24 h after the addition of amyloglicosidase. \*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test), \*\*p<0,05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t-test)

cholesterol and triglyceride levels, in diabetic rats. Similarly to MSF, tyramine also significantly decreased glycemia, TG and VLDL. The association of MSF or TYR with GLI did not decrease those values further. One interesting finding was the complete blockade of the increase in creatinine values, observed in diabetic animals after treatment with MSF or TYR. A similar effect was seen with GLI. Furthermore, a great decrease in AST values was observed, after the treatment of diabetic animals with the association of GLI+TYR.

Our results showed that the mechanism of the hypoglycemic action of MSF and TYR does not seem to be that of GLI, since no potentiation was observed

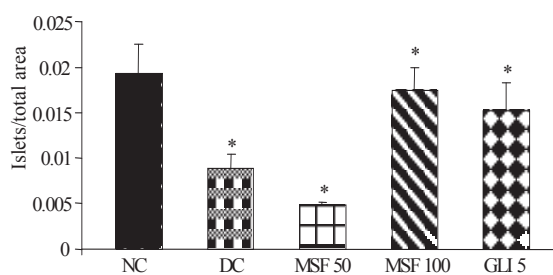


Fig. 2: Number of pancreatic islets in diabetic rats treated with the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata* and glibenclamide (GLI). Values represent mean±SEM of 6-8 animals. NC = non-diabetic controls. Diabetic rats were treated, orally for 5 days, with distilled water (DC), MSF (50 and 100 mg kg<sup>-1</sup>), or GLI (5 mg kg<sup>-1</sup>) and five days after treatments the pancreas was dissected and stained with hematoxylin-eosin for the counting of the number of islets, by optic microscopy. \*p<0.05 as compared to NC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test); \*\*p<0.05 as compared to the same group before treatment (Student's paired t-test)

after the association of GLI+TYR. Glibenclamide also called glyburide is a sulfonylurea that has as its major action the increase in insulin release from the pancreas or an insulinotropic action<sup>[18]</sup>. Insulin secretion is controlled by the membrane potential of beta cells, which depends on the activity of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels (K<sub>ATP</sub> channels). These channels close, following an increase in the cytoplasmic ATP/ADP ratio. This leads to membrane depolarization, opening of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels, elevation of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration and stimulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis of the insulin-containing granules. These channels represent then a target for hypoglycemic sulfonylureas<sup>[19,20]</sup>.

Furthermore, we showed that the hyperglycemic effect of diazoxide, an ATP-dependent potassium (K<sub>ATP</sub>) channel agonist, was not reversed by MSF or TYR, suggesting again that their mechanism of action is not similar to that of GLI. Diazoxide is an antihypertensive drug which is known to open K<sub>ATP</sub> and to hyperpolarize plasma membranes, including those of pancreatic-beta cells, thus decreasing insulin secretion<sup>[21]</sup>. In this sense, its mechanism of action opposes that of GLI.

Recent reports demonstrated that the oral administration for 7 days, with doses of 100 and 200 mg kg<sup>-1</sup> of the aqueous extract from *C. verticillata*,

reduced hyperglycemia in alloxan-induced diabetic rats<sup>[22]</sup>. The tea from this plant presents a hypoglycemic activity in normoglycemic rats and this effect is probably due to the presence of flavonoids<sup>[13]</sup>. Furthermore, a recent work showed that tyramine, a tracer amine also present in *C. verticillata*, at the dose of 26  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , i.p., administered for 3 weeks to diabetic rats, resulted in decreased hyperglycemic responses<sup>[23]</sup>. The chronic exposure to tyramine, an amine oxidase substrate, led to an improvement of glucose tolerance in diabetic rats<sup>[16]</sup>. In addition, the acute exposure to tyramine reduced hyperglycemia and triglycerides in alloxan-diabetic rats<sup>[15]</sup> and these results were similar to ours. In the present study, we also showed that tyramine decreased the percentage of glycated hemoglobin. Glycation of Hb has been implicated in nephropathy and retinopathy in diabetes mellitus and is primarily used to identify plasma glucose concentration over a prolonged period of time<sup>[24]</sup>. Furthermore, MSF decreased lesion and increased the number of pancreatic beta cells, protecting cells against the alloxan-induced cytotoxicity.

Pancreatic islets can suffer functional and morphological alterations due to several factors, including drugs that produce free radicals, such as alloxan and streptozotocin<sup>[25]</sup>. Some reports indicate that the formation of superoxide and hydroxyl radicals is responsible for the alloxan-induced cytotoxicity<sup>[26,27,28]</sup>. Immunohistochemical studies demonstrated that the pancreas from alloxan-induced diabetic animals showed a 70% reduction of beta cell areas. At the same time, there was an increase in the areas occupied by delta cells and no alteration in glucagon-producing cells<sup>[29]</sup>. Another study<sup>[30]</sup> showed decreases in the number of insulin positive cells and increases in the number of cells expressing somatostatin in rats submitted to alloxan-induced diabetes. These authors did not observe any alteration regarding to glucagon producing cells. We also observed that the significant decrease in the liver glycogen content of diabetic rats were totally or partially blocked after MSF treatment. The anti-hyperglycemic activity of both MSF and TYR may be due to increased utilization of glucose. In diabetic rats, high glucose levels and decreased hepatic glycogen could be attributed to low availability of glycogen synthetase, as demonstrated elsewhere<sup>[31,32,33]</sup>.

In order to clarify the mechanism of action of the hypoglycemic effect of *C. verticillata*, we studied the effects of the association of TYR plus MET on several biochemical parameters, in the serum of alloxan-induced diabetic rats. Unlikely the results observed with the association of GLI plus TYR, a clear potentiation

was seen as far as the decrease in glucose levels is concerned, after the treatment of diabetic animals with the association of MET plus TYR. Under this experimental condition, values of glycemia were near normality. Our data suggest that the mechanism of hypoglycemia observed after MSF and TYR treatments of alloxan-induced diabetic rats is similar to that shown by MET.

Metformin is an oral hypoglycemic drug of the biguanide class and its mechanism of action remains elusive. The blood glucose-lowering action of the drug does not depend on the functioning of pancreatic cells. Currently proposed mechanisms of action include: a) reduced hepatic and renal gluconeogenesis; b) slowing of glucose absorption from the gastrointestinal tract, with increased glucose conversion to lactate by enterocytes; c) direct stimulation of glycolysis in tissues, with increased glucose removal from the blood; and d) reduction of plasma glucagon levels. As a matter of fact, a combination therapy with glibenclamide plus metformin is considered as an optimal and rational therapeutic treatment of patients with type 2 diabetes mellitus, giving better glycemic control than the monotherapy with either drug<sup>[34]</sup>.

It has been demonstrated that metformin alone mimics insulin's ability to increase receptor tyrosine kinase activity and stimulate phospholipase C<sup>[35]</sup>. More recently, MET was shown<sup>[36,37]</sup> to activate the AMP-activated protein kinase cascade, via an adenine nucleotide-independent mechanism. Then, it is possible that the hypoglycemic activity of MSF and TYR involves a similar mechanism of action and at least in part these drugs may act by activating the AMPK. Furthermore, it has been demonstrated that amine oxidase substrates inhibit the lipolytic activity in rat adipocytes. These data suggest that inhibition of lipolysis is a novel insulin-like effect of tyramine that is mediated by hydrogen peroxide, generated during amine oxidation<sup>[15,16]</sup>.

In conclusion, our results showed that the oral administration of the methanol soluble fraction from *C. verticillata* had a beneficial effect on the rat diabetic state, reducing hyperglycemia as well as the hyperlipidemia, similarly to that presented by tyramine, a bioactive constituent of the plant. Furthermore, at least in part, the hypoglycemic activity of MSF and tyramine is similar to that shown by MET, probably increasing pancreatic insulin and opening  $\text{K}^+$  channels. Data in the literature relate that flavonoids and tyramine possess both hypoglycemic and hypotriglyceridemic effects in diabetic animals<sup>[23,38]</sup>. Therefore, studies with flavonoids and tyramine, as well as with other constituents present in the plant, are underway to

further elucidate their mechanisms of action and involvement with the putative anti-diabetic properties of *C. verticillata*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the technical assistance of Ms. M. Vilani Rodrigues Bastos and to Prof. M.O.L.Viana for the orthographic revision of the manuscript. The work had the financial support from the Brazilian National Research Council (CNPq).

#### REFERENCES

1. Davis, S.N., 2006. Insulin, Oral Hypoglycemic Agents and the Pharmacology of the Endocrine Pancreas. In: Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. Brunton, L.L. (Ed.). McGraw-Hill, New York, pp: 1613-1645.
2. Grover, J.K., V. Vats, S.S. Rathi and R. Dawar, 2001. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. J. Ethnopharmacol., 76: 233-238.
3. Lino, C.S., J.P. Diógenes, B.A. Pereira, R.A. Faria, M. Andrade-Neto and R.S. Alves *et al.*, 2004. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. Biol. Pharm. Bull., 27: 125-127.
4. Quilez, A.M., M.T. Saenz, M.D. Garcia and R. de la Puerta, 2004. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. J. Pharm. Pharmacol., 56: 1185-1189.
5. Garcia, M.D., A.M. Quilez, M.T. Saenz, M.E. Martinez-Dominguez and R. de la Puerta, 2000. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. J. Ethnopharmacol., 71: 395-400.
6. Beltrame, F.L., A.G. Ferreira and D.A. Cortez, 2002. Coumarin glycoside from *Cissus verticillata*. Nat. Prod. Lett., 16: 213-216.
7. Pepato, M.T., A.M. Baviera, R.C. Vendramini, M.P. Perez, I.C. Kettelhut, I.L. Brunetti, 2003. *Cissus verticillata* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin diabetic rats. Biotechnol. Applied Biochem., 37: 15-20.
8. Panthong, A., W. Supraditaporn, D. Kanjanapothi, T. Taesotikul and V. Reutrakul, 2006. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. J. Ethnopharmacol., 26: 1-7.
9. Medeiros, A.C.C., A.M.R. Lacerda, T.G. Vale and G.S.B. Viana, 2002. Efeitos analgésicos do extrato aquoso de *Cissus sicyoides* L. (abstract). XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Cuiabá-MT.
10. Lino, C.S., T.P. Sales, C.P. Leite, F.S.O. Alexandre, E.R. Silveira and M.G.R. Queiroz, *et al.* 2006. Atividade Analgésica da Fração Solúvel de *Cissus sicyoides* e da tiramina. Simpósio Brasileiro de Plantas Mediciniais. Salvador-Ba, In Livro de resumos.
11. Panthong, A., W. Supraditapom, D. Kanjanapothi, T. Taesotikul and V. Reutrakul, 2007. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. J. Ethnopharmacol., 110: 264-270.
12. Beltrame, F.L., J.L. Sartoretto, R.B. Bazotte, R.N. Cuman and D.A.G. Cortez, 2001. Estudo fitoquímico e avaliação do efeito antidiabético do *Cissus verticillata* L (Vitaceae). Química Nova, 24: 783-785.
13. Barbosa, W.L.R., W.R.A.S. Santos, L.N. Pinto and I.C.C. Tavares, 2002. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. Rev. Bras. Farmacognosia., 12: 13-15.
14. Alexandre, F.S.O., 2007. Análise fitoquímica de plantas do Ceará: Potencial farmacológico de *Cissus verticillata* e composição volátil de *Myrcia sp.* Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, pp: 111.
15. Morin, N., V. Visentin, D. Calise, L. Marti, A. Zorzano and X. Testar *et al.*, 2002. Tyramine stimulates glucose uptake insulin-sensitive tissues *in vitro* and *in vivo* via its oxidation by amine oxidases. J. Pharmacol., 303: 1238-1247.
16. Visentin, V., P. Marq, S. Bour, C. Subra, D. Prevot and N. Morin *et al.*, 2003. Effect of prolonged treatment with tyramine on glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Physiol. Biochem., 59: 225-232.
17. Sales, T.P., C.S. Lino, J.F. Magalhães, F.S.A. Oliveira, V.R. Bastos, E.R. Silveira and M.G.R. Queiroz *et al.*, 2005. Atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da fração semi-purificada de *Cissus verticillata*. I Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais (SBPM/NE), Fortaleza-CE.
18. Fuhlendorff, J., P. Rorsman, H. Kofod, C.L. Brand, B. Rolin, P. MacKay, R. Shymko and R.D. Carr, 1998. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. Diabetes, 47: 345-351.



19. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, 1989. Electrophysiology of the  $\beta$  cell. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 54: 87-144. 20.
20. Inagaki, N., T. Gonoi, J.P. Clement, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino and J. Bryan, 1995. Reconstitution IATP: An inward rectifier subunit plus the sulphonylurea receptor. *Science*, 270: 1166-1170.
21. Raju, B. and P. Cryer, 2005. Mechanism, temporal patterns and magnitudes of the metabolic responses to the  $K_{ATP}$  channel agonist diazoxide. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 288: E80-E85.
22. Viana, G.S.B., A.C.C. Medeiros, A.M.R. Lacerda, L.K.A.M. Leal, T.G. Vale and F.J.A. Matos, 2004. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus verticillata*. *BMC Pharmacol.*, 4: 1-7.
23. Visentin, V., S. Bour, J. Boucher, D. Prevot, P. Valet and C. Ordener *et al.*, 2005. Glucose handling in streptozotocin-induced diabetic rats is improved by tyramine but not the amine oxidase inhibitor semicarbazide. *Eur. J. Pharmacol.*, 522: 139-146.
24. Baynes, J. and M.H. Donniczack, 2000. *Bioquímica Médica*. Ed. Manole, São Paulo.
25. Montillapl, V.J.F., I.F. Tnez, M.C. Munoz de Agueda, M.E. Valdevira and E.S. Cabrera, 1998. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effects of melatonin. *J. Pineal. Res.*, 25: 94-100.
26. Waguri, M., K. Yamamoto, J.I. Miyagawa, Y. Tochino, K. Yamamori, Y. Kajimoto, H. Nakajima, H. Watada, Y. Yamasaki, T. Hanafusa and Y. Matsuzawa, 1997. Demonstration of two different processes of  $\beta$  cells regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. *Diabetes*, 46: 1281-1290.
27. Ahrén, B. and G. Sundkvist, 1995. Long-term effects of alloxan in mice. *Int. J. Pancreatol.* 7: 197-201.
28. Zhang, H., J.M. Zdzilek and U.T. Brunk, 1992. Alloxan cytotoxicity involves lysosomal damage. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, 100: 309-316.
29. Rastogik, S., L. Lickley, M. Jokay, S. Efendic and M. Vranic, 1990. Paradoxical reduction in pancreatic glucagon with normalization of somatostatin and decrease in insulin in normoglycemic alloxan-diabetic dogs: A putative mechanism of glucagon irresponsiveness to hypoglycemia. *Endocrinology*, 126: 1096-1104.
30. Lima, M.A., L.M.B. Lima, D.P.C. Rita, F.C. Navarro, R.S. Tatsukawa, G.A. Pereira, L.C. Reis, M.E.A. Abreu and M.F. Borges, 2001. Quantitative analysis of cells of the pancreatic islets in rats under effect of alloxan. *Medicina, Ribeirão Preto*, 34: 308-314.
31. Goldstein, S., A. Simpson and P. Saenger, 1990. Hepatic drug metabolism increase in poorly controlled insulin dependent diabetes mellitus. *Acta Endocri.*, 12: 3550-3558.
32. Mathieu, B. and S. Willey, 1984. The hepatic defect in glycogen synthesis in chronic diabetes involves component of synthase phosphatase. *Biochem. J.*, 21: 7427-7435.
33. El-Missiry, M.A. and A.M. El Gindy, 200. Amelioration of alloxan induced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann. Nutr. Met.*, 44: 97-100.
34. DeRosa, G., 2006. Glibenclamide plus metformin combination tablets are effective, convenient and well tolerated in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs and Therapy Perspectives*, 22: 1-6.
35. Stith, B.J., M.L. Goalstone, R. Espinoza, C. Mossel, D. Roberts and N. Wiernsperger, 1996. The antidiabetic drug metformin elevates receptor tyrosine kinase activity and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes. *Endocrinol.*, 137: 2990-2999.
36. Hawley, S.A., A.E. Gadalla, G.S. Olsen and G. Hardie, 2002. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*, 51: 2420-2425.
37. Zou, M.H., S.S. Kirkpatrick, B.J. Davis, J.S. Nelson, W.G. Wiles IV, U. Schlattner, D. Neumann, M. Brownlee, M.B. Freeman and M.H. Goldman, 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 279: 43940-43951.
38. Mori, T., Y. Nishikawa, Y. Takata, N. Kashiuchi and N.J. Ishira, 2001. Effect of insulin leaf extraction on development of diabetes-Comparison between normal, streptozotocin-induced diabetic rats and hereditary diabetic mice. *Japanese Soc. Nutr. Food Sci.*, 54: 197-203.

## Antioxidant Activity of a *Cissus verticillata* Fraction and Tyramine, its Bioactive Constituent, on Alloxan-Induced Diabetic Rats

Cleide de Sousa Lino<sup>1</sup>, Thiago de Paiva Sales<sup>1</sup>, Francisco S. Oliveira Alexandre<sup>2</sup>, Jamile M. Ferreira<sup>3</sup>, Daniel Freire de Sousa<sup>3</sup>, Patrícia Bezerra Gomes<sup>1</sup>, Jeferson Falcão do Amaral<sup>1</sup>, Flávio D. Maia<sup>1</sup>, Edilberto R. Silveira<sup>2</sup>, Maria Goreti Rodrigues de Queiroz<sup>3</sup>, Francisca Cléa Florenço de Sousa<sup>1</sup> and Glauce Socorro de Barros Viana<sup>\*,1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, <sup>2</sup>Department of Organic and Inorganic Chemistry, and <sup>3</sup>Department of Clinical and Toxicological Analyses, Federal University of Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo 1127, CEP 60430-270, Fortaleza, Brazil

**Abstract:** In the present study, the antioxidant activity of a methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, used in Brazil and elsewhere as a hypoglycemic and antidiabetic medicinal plant, and tyramine (TYR), one of its main bioactive constituents, was assessed. For this, male Wistar rats were submitted to alloxan injection (40 mg/kg, i.v.) in order to induce a diabetic state and, 48 h later, glycemia was determined. Animals were distributed into groups: normal controls (NC); diabetic controls (DC); DC plus MSF; and DC plus TYR. Another group was treated with glibenclamide (GLI), used as a positive control. After 5-day treatments, animals were sacrificed for liver dissection, and determination of antioxidant markers such as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), catalase and nitrite concentrations. The antioxidant effect was also evaluated on the pentobarbital-induced sleeping time, before and after CCl<sub>4</sub> treatment. Under our experimental conditions, diabetic rats did not present any alteration in liver lipid peroxidation, before (DC) or after treatments with the MSF; TYR or GLI, as compared to normal controls (NC). Levels of GSH were significantly increased in 79% in DC, as related to NC, and the effects were partially reversed in diabetic rats, after MSF treatments at the higher dose. However, while similar effects were observed after TYR and GLI, both drugs brought values of GSH to normality. The DC group had increased liver catalase activity, as compared to NC, and these effects were partially reversed by MSF and almost completely by TYR and GLI. Significant increases were also detected in nitrite concentrations in livers of DC, as an index of free radical formation, and a large reduction was observed after MSF, TYR and GLI treatments of diabetic rats, as compared to NC. MSF and TYR also prevented prolongation of the pentobarbital-induced sleeping time by CCl<sub>4</sub>, suggesting hepatoprotective and anti-oxidative effects. In conclusion, we showed that the antioxidant activity probably plays an important role in the antidiabetic effect of *C. verticillata*, and TYR is at least in part responsible for this property.

**Keywords:** *Cissus verticillata*, hypoglycemic activity, free radicals formation, antioxidant activity.

### INTRODUCTION

Diabetes is associated with a significant oxidative stress, and this oxidative damage may contribute to several diabetic complications [1]. Reactive oxygen species are known to be an important part of the defense mechanisms against infection, but excessive generation of free radicals or unsaturated fatty acids have been implicated in the pathogenesis of vascular diseases [2]. Diabetic patients have an increased incidence of vascular diseases, and it has been shown that free radical activity is elevated during diabetes [3]. In addition, free radicals seem to be responsible for the development of diabetic macroangiopathy as well as microangiopathy [4]. Previous studies [5, 6] demonstrated that increased free-radical reactions in patients with DM type II were responsible for the development of vascular changes. As a matter of fact, oxygen-derived free radicals have been suggested to

induce malfunction of endothelial cells, leading to diabetic angiopathy [7], and the development of vascular complications in diabetes correlates with the intensity of hyperglycemia [8].

It has been shown that cells adapt to oxidative stress conditions but, under hyperglycemic conditions, progressive glycosylation of the enzymatic proteins leads to decreases in their activities [9]. Diabetes mellitus (DM) is characterized by hyperglycemia together with biochemical alterations of glucose and lipid peroxidation [10]. Thus, some complications of DM are associated with the increased activity of free radical-induced lipid peroxidation and accumulation of lipid peroxidation products [11].

Low levels of Vitamin E are associated with increased incidence of diabetes, and some reports suggest that people with diabetes have decreased levels of antioxidants [12, 13]. Another study [14] suggested that diabetes altered the metabolic state of oxidation-reduction type reactions, pointing out to a potential benefit of therapeutic intervention with antioxidants. The loss of antioxidant capacity is statistically associated with accelerated aging processes in diabetic pa-

\*Address correspondence to this author at the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Rua Barbosa de Freitas, 130/1100, 60.170-020, Fortaleza, Brazil; Tel: 55 85 3242-3064; E-mail: osorio@roadnet.com.br

tients, due to an increase in basal oxidation products of erythrocytes associated with monosaccharide autooxidative glycation [15, 16].

*Cissus verticillata* (syn. *C. sicyoides*, Vitaceae) is a medicinal plant popularly known in Brazil as “cipó-pucá, anil-trepador, and cortina”. Leaves decoction from *C. verticillata* called elsewhere as princess wine is widely taken as a popular remedy for diabetes in Brazil, where it is also known as “insulina vegetal”. Several substances were isolated from *C. verticillata*. Thus, one work reported the presence in this species of tannins, steroid-triterpenes, amino acids, lipids and flavonoids [17], when the phytochemical analysis of the plant showed the presence of alkaloids, triterpenes, steroids, flavonoids, tannins, saponins and coumarins, among others [18, 19]. Recently [20], tyramine was also for the first time isolated from the plant.

Some studies [21, 22] have shown that tyramine administration to diabetic rats increases glucose disposal and reduces hyperglycemia. We also demonstrated [23] antidiabetic and hypoglycemic actions of the aqueous extract of the plant, as well as with tyramine, known to be present in this species [24]. Thus, the objectives of the present work was to further explore our previous data, by focusing now on possible antioxidant effects of a *C. verticillata* fraction, as well as of tyramine, one of its active constituents, in the model of alloxan-induced diabetes in rats.

## METHODS

**Animals.** Male Wistar rats (180-200 g) from the Animal House of the Federal University of Ceará, Brazil, were used. Animals were maintained at standard conditions (21-23°C), controlled humidity, 12 h light/dark cycle, with water and food *ad libitum*. Experiments were conducted according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals from the NIH, USA.

**Plant and fractions isolation procedures.** Fresh leaves of *C. verticillata* were harvested from the Prof. F.J.A. Matos Medicinal Plants Garden, at the Federal University of Ceará, Brazil. Voucher specimens (No. 32240), identified at Kew Garden, UK, are deposited at the Prisco Bezerra Herbarium at the same University.

**Methanol Soluble Fraction Preparation (MSF).** A three hundred gram aliquot of fresh leaves from *Cissus verticillata* was submitted (twice) to decoction with 500 mL of H<sub>2</sub>O, for 5 min. The procedure was repeated three more times, to yield a 4 L solution, from a total of 1.2 kg of leaves. After lyophilization, 29.5 g of a light brown solid residue was obtained, which in turn was stirred for 30 min (twice) with 50 mL of methanol, to afford 15.67 g of a viscous brown residue, after methanol rotoevaporation (MSF), and 11.35 g of the methanol insoluble residue (MIR). Among all the fractions tested for antidiabetic activity, the most active one was the MSF and, for this reason, it was chosen for further analyses [20].

**Isolation of tyramine (present in *C. verticillata* leaves) from the MSF.** MSF (5.1 g) was dissolved in MeOH and submitted to gel permeation over Sephadex LH-20 (100 g), on a 500 mL glass column (5 cm diameter), by elution with MeOH. This step resulted in 24 fractions (9 mL each), followed by two larger fractions (125 and 250 mL), and finally

by a 500 mL fraction eluted with MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1. After TLC comparison, three major fractions were obtained by pooling the similar fractions: CvMsF<sub>8-12</sub> (1.23 g), CvMsF<sub>13-18</sub> (1.54 g) and CvMsF<sub>19-24</sub> (1.01 g) by <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOD). Analysis of all major fractions revealed the presence of a major compound in F<sub>19-24</sub> that was later designated tyramine rich fraction (TRF). Besides the tyramine characteristic pair of doublets in the aromatic region (6.77 and 7.10 ppm, J 8.4 Hz) and the pair of triplets in the aliphatic region (2.87 and 3.12 ppm), several signals between 3.3 and 4.3 ppm, followed by doublets at 4.5 and 5.1 ppm, were indicative of the presence of sugar components. TRF was rechromatographed on Sephadex LH-20 by elution with MeOH, to yield 12 fractions (9 mL each) that were compared by TLC and pooled by similarity. F<sub>6-8</sub> (750 mg) was redissolved in MeOH and, then, EtOAc was added dropwise until the formation of a light yellow precipitate. Filtration afforded 390 mg of tyramine, after TLC co-chromatography and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral analyses (157.8, 116.9, 130.9, 128.6, 42.4 and 33.9 ppm). These methods were performed either separately with tyramine from TRF and standard tyramine, or in a 1:1 mixture. The process was repeated 4 times, in order to provide enough material for all pharmacological assays [20]. For technical reasons (low yield) the standard tyramine used in the present study was purchased from Sigma Chem. Co. (Mo, USA). Drugs were dissolved in distilled water before use.

**Procedure for determination of the antioxidant activity.** After 5 days of oral (intra-gastric gavage) treatments, animals were killed by cervical dislocation. Then, the liver was immediately dissected and homogenized in 1.15% KCl, at a volume equivalent to 10 times its weight (1g/10 mL solution). The mixture was centrifuged (5,800 rpm, 10 min at 10°C), and the supernatant used for biochemical determinations (TBARS, GSH, catalase, and nitrite).

**Determination of lipid peroxidation levels in liver tissue.** To 10% liver homogenates (0.5 mL) prepared in 1.15% KCL, were added 0.9 mL of sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) and 0.5 mL of the free radicals formation catalyzing medium, containing FeSO<sub>4</sub> (0.01mM) and ascorbic acid (0.1 mM). The mixture was maintained for 30 min at 37°C when the reaction was stopped by the addition of 1 mL of 10% trichloroacetic acid, TCA. Then, after centrifugation (3,000 rpm, 15 min), 1 mL of 0.8% thiobarbituric acid was added to the supernatant. The mixture was maintained in boiling water for 15 min. After cooling, the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration was measured spectrophotometrically at 532 nm. Results expressed as nmol/mg/protein were calculated from a standard MDA curve, which is a by-product of the lipid peroxidation reaction [25].

**Reduced glutathione (GSH) and sulphhydryl group determinations.** GSH (L-γ-Glutamyl-L-cisteinyl-glycine) contains the most abundant intracellular thiol (-SH) groups, and constitutes an important antioxidant system in the cell [26]. The GSH concentration was determined by a modified Ellman (1959) method [27]. Briefly, to a 10% liver homogenate (400 μL) prepared in 10% EDTA (0.02 M), were added 320 μL and 80 μL of a 50 % TCA solution. After centrifugation, 3,000 rpm, for 15 min at 4°C, 800 μL of a 0.4

M Tris-HCl (pH 8.9) were added to a 400  $\mu$ L supernatant sample, followed by the addition of 20  $\mu$ L of 0.01 M dithionitrobenzoic acid (DTNB). GSH concentration was spectrophotometrically determined at 420 nm, 1 min after the DTNB addition. Results were calculated from a standard GSH curve and expressed as  $\mu$ g/g tissue.

**Determination of catalase activity in the liver.** Liver tissue was homogenized in a 0.1 M sodium phosphate buffer solution, pH 7.0, at an equivalent volume of 200 times its weight. Then, the homogenate was centrifuged at 5,800 rpm, 10 min at 4°C, the upper layer was discarded and the bottom layer was used for spectrophotometric measurements at 230 nm [28]. In the cuvette, were added 980  $\mu$ L of the reaction medium (15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in 1 M Tris-HCl buffer), containing 5 mM EDTA, pH 8.0, and 20  $\mu$ L of the sample diluted in the Tris-HCl buffer. Initial and final absorbances were recorded at 230 nm, after 1 and 6 min, respectively. A standard curve was established using purified catalase (Sigma, MO, USA). Results were expressed in nmol/min/mg protein. Protein was determined by the Lowry method [29].

**Determination of the nitrite concentration.** The Griess reagent (0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride in distilled water and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) is widely used to detect the presence of nitrite in samples of urine, plasma and tissues. The diazotization reaction forms a pink chromophore presenting a peak of absorption at 560 nm. The 10% liver homogenate prepared in saline was centrifuged at 3,000 for 10 min, and 100  $\mu$ L of the Griess reagent were added to 100  $\mu$ L of supernatant. The reaction mixture was incubated for 10 min at room temperature. For blanks, 100  $\mu$ L of the Griess reagent and 100  $\mu$ L of saline were used. The absorbance was measured at 560 nm in a microplate reader and the nitrite concentration was determined from a standard NaNO<sub>2</sub> curve [30].

**Barbiturate-induced sleeping time.** Five groups (9-14 animals each) of male Swiss mice (25-35 g) were treated with the MSF (50 and 100 mg/kg, p.o.) and TYR (1 and 2 mg/kg, p.o.). Controls were treated with vehicle (distilled water, 10 ml/kg, p.o.). After 1 h treatments, animals were injected with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.), according to Dandiya and Collumbine, 1959 [31]. Animals were then evaluated for the sleep latency and duration of sleep.

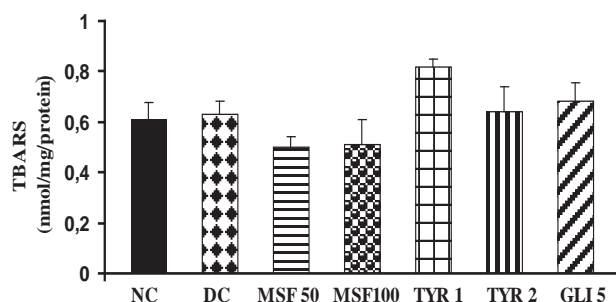
**Effect of CCl<sub>4</sub> on the barbiturate-induced sleeping time.** Five groups (6-9 animals each) of male Swiss mice (25-35 g) were treated with the MSF (50 and 100 mg/kg, p.o.) and TYR (1 and 2 mg/kg, p.o.). Controls were treated with the vehicle (distilled water, 10 ml/kg). After 1 h treatments, animals were injected with 20% CCl<sub>4</sub> in olive oil (1 ml/kg, s.c.), according to Montila *et al.*, 1990 [32]. Twenty four hours after CCl<sub>4</sub> administration, the animals were treated with sodium pentobarbital, and evaluated for the sleep latency and duration of sleep.

## RESULTS

**Evaluation of the antioxidant activity of the methanol soluble fraction (MSF), tyramine (TYR), and glibenclamide (GLI) in alloxan-induced diabetic rats.** Since in previous studies we showed no alteration in serum hepatic transaminases from alloxan-induced diabetic rats after treatment with MSF or TYR, we decided to investigate the alloxan-induced hepatotoxicity, in the absence and presence of

MSF and TYR, by measuring the levels of lipid peroxidation, enzymatic (catalase) and nonenzymatic (GSH) antioxidant systems, as well as nitrite concentration.

**Determination of effects of MSF, TYR and GLI, on the rat liver lipid peroxidation.** In Fig. (1), we present the effects of MSF, TYR and GLI on the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), a parameter used to measure the alloxan-induced lipoperoxidation. Results showed that alloxan, at the dose of 40 mg/kg, i.v., did not alter TBARS concentration in diabetic control rats (DC), as compared to normal controls (NC) treated with distilled water only. Similarly, diabetic animals treated with MSF (50 and 100 mg/kg), TYR (1 and 2 mg/kg) or GLI (5 mg/kg), orally for 5 days, did not significantly alter TBARS levels in the liver.

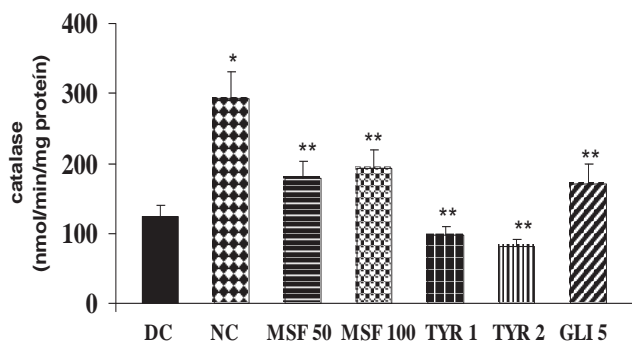


**Fig. (1).** Effects of MSF from *Cissus verticillata*, tyramine (TYR) and glibenclamide (GLI) on the activity of thiobarbituric reactive substances (TBARS), in the liver of diabetic rats. Diabetic rats were treated with distilled water (DC) or MSF (50 and 100 mg/kg), TYR (1 and 2 mg/kg), GLI (5 mg/kg), orally for 5 days, and after treatments livers were dissected and homogenized. Values represent mean  $\pm$  SEM from 6 to 11 animals.

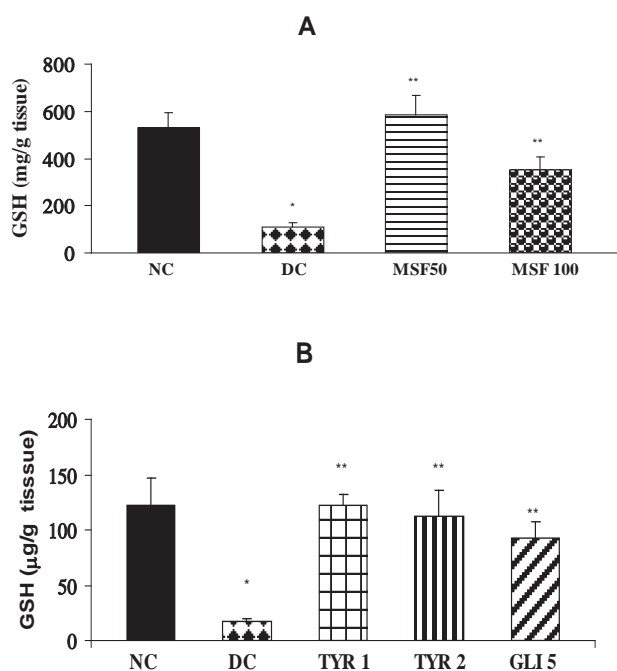
**Determination of effects of MSF, TYR and GLI, on catalase activity in the rat liver.** Fig. (2) shows that the catalase activity (mmol/min/mg protein) in livers of the NC group ( $0.13 \pm 0.019$ ) was significantly increased, as related to the DC group ( $0.29 \pm 0.044$ ). However, the animals treatment with MSF for 5 days significantly inhibited the enzyme activity. Thus, at the lower dose, MSF (50 mg/kg, p.o.) reduced in 45% the catalase activity ( $0.16 \pm 0.018$ ), as compared to DC. There was no dose effect relationship, since at the higher dose (100 mg/kg, p.o.) the effect was lower, corresponding to a 31% reduction of enzyme activity ( $0.21 \pm 0.028$ ) and suggesting that, at this dose range, MSF was already presenting its maximal effect.

**Determination of effects of MSF, TYR or GLI, on reduced glutathione levels in the rat liver.** Fig. (3A) shows the effect of MSF on reduced glutathione (GSH) levels induced by alloxan, in rat livers. The liver GSH concentrations ( $\mu$ g/mg tissue) decreased from  $528.9 \pm 64.3$ , in normal controls (NC) treated with distilled water only, to  $111.2 \pm 17.1$ , in diabetic controls (DC) treated with distilled water plus alloxan. The treatment of diabetic animals for 5 days with MSF (50 e 100 mg/kg, p.o.) significantly increased hepatic GSH levels to  $584.8 \pm 83.0$  and  $350.6 \pm 57.6$ , respectively. In Fig. (3B), the liver GSH concentrations ( $\mu$ g/mg tissue) decreased from  $122.0 \pm 24.6$  in the NC group to  $17.1 \pm 2.8$  in the DC group. The treatment of diabetic animals with TYR (1 e 2 mg/kg, p.o.) or GLI (5 mg/kg, p.o.) brought GSH

levels to normal values (TYR 1:  $121.9 \pm 23.9$ ; TYR 2:  $112.3 \pm 15.3$ ; GLI 5:  $92.1 \pm 6.2$ ).



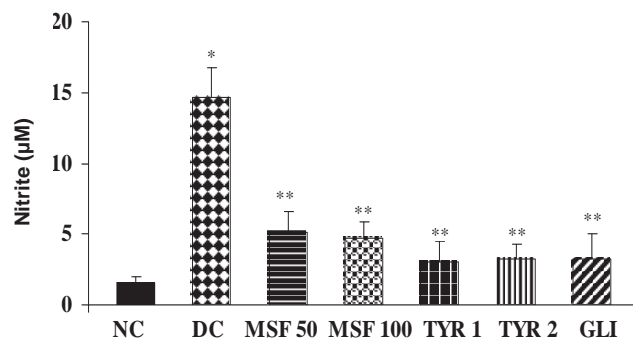
**Fig. (2).** Effects of MSF from *Cissus verticillata*, TYR and GLI on the activity of catalase, in the liver of diabetic rats. Diabetic rats were treated with distilled water (DC) or MSF (50 and 100 mg/kg), TYR (1 and 2 mg/kg), GLI (5 mg/kg), orally for 5 days, and after treatments livers were dissected, homogenized and processed for catalase activity, as described in Material and Methods. Values represent mean  $\pm$  SEM from 5 to 10 animals. \*  $p < 0.05$ , as compared to NC; \*\*  $p < 0.05$ , as compared to DC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test).



**Fig. (3).** Effects of the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata* (A), tyramine (TYR) and glibenclamide GLI (B) on the activity of reduced glutathione (GSH), in the liver of diabetic rats. Diabetic rats were treated with distilled water (DC) MSF (50 and 100 mg/kg), TYR (1 and 2 mg/kg), or GLI (5 mg/kg), orally for 5 days, and after treatments livers were dissected and homogenized and the GSH content was estimated according to Material and Methods. Values represent mean  $\pm$  SEM of 5 to 11 animals. \*  $p < 0.05$ , as compared to NC; \*\*  $p < 0.05$ , as compared to DC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test).

**Determination of MSF, TYR and GLI, on nitrite levels in the rat liver.** Fig. (4) shows a significant increase in nitrite levels ( $\mu\text{M}$ ) in livers of DC rats ( $14.7 \pm 2.06$ ), as com-

pared to NC ( $1.6 \pm 0.34$ ). However, MSF (50 and 100 mg/kg, p.o.) reduced nitrite levels in 65% ( $5.1 \pm 1.51$ ) and 68% ( $4.7 \pm 1.18$ ), respectively. A similar picture was observed after the treatment of diabetic rats with TYR (1 and 2 mg/kg, p.o.) that reduced nitrite levels in 79 ( $3.0 \pm 1.46$ ) and 82% ( $3.2 \pm 1.14$ ). Similar data were observed after GLI treatment of diabetic rats, showing a 78% decrease in nitrite levels, as compared to NC ( $3.2 \pm 1.81$ ).



**Fig. (4).** Effects of the methanol soluble fraction (MSF) from *Cissus verticillata*, tyramine (TYR) and glibenclamide (GLI) on the reduction of nitrite levels, in the liver of diabetic rats. Diabetic rats were treated with distilled water (DC) or MSF (50 and 100 mg/kg), TYR (1 and 2 mg/kg), GLI (5 mg/kg), orally for 5 days, and after treatments livers were dissected, homogenized and processed for nitrite determination according to Material and Methods. Values represent mean  $\pm$  SEM from 4 to 6 animals. \*  $p < 0.05$ , as compared to NC; \*\*  $p < 0.05$ , as compared to DC (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test).

**Determination of effects of MSF and TYR on the pentobarbital-induced sleeping time, in the absence and presence of  $\text{CCl}_4$  treatment, in rats.** Tables 1 and 2 show that, while sleeping latency was unaltered by MSF it was increased by 55 and 36%, by TYR (1 and 2 mg/kg, p.o.), respectively. However, neither MSF nor TYR affected sleep duration. In the presence of  $\text{CCl}_4$ , a significant prolongation (57%) of the pentobarbital-induced sleeping time was observed, and the lower dose of MSF was unable to block that effect. However, MSF at the higher dose, as well as TYR at both doses, completely reversed the  $\text{CCl}_4$  prolongation of the pentobarbital-induced sleeping time, and values were close to those demonstrated in the absence of  $\text{CCl}_4$  administration.

**Table 1.** Effects of the Methanol Soluble Fraction (MSF) from *Cissus verticillata* (MSF) and Tyramine (TYR) on the Pentobarbital-Induced Sleeping Time, in Mice

| Group (mg/kg, p.o) | Sleep latency (s)                | Sleep Duration (min) |
|--------------------|----------------------------------|----------------------|
| Control            | $233 \pm 16.8$ (9)               | $60 \pm 4.7$         |
| MSF 50             | $198 \pm 9.2$ (10)               | $59 \pm 6.1$         |
| MSF 100            | $227 \pm 10.2$ (10)              | $50 \pm 5.4$         |
| TYR 1              | $516 \pm 55.3$ (10) <sup>a</sup> | $59 \pm 7.5$         |
| TYR 2              | $364 \pm 39.5$ (14) <sup>a</sup> | $48.3 \pm 7.4$       |

Animals were treated with the MSF (50 e 100 mg/kg), TYR (1 e 2 mg/kg), and after 1 h they were injected with pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) when the parameters studied (sleep latency and sleep duration) were evaluated. Values are means  $\pm$  SEM of the number of animals in parentheses. <sup>a</sup> $p < 0.05$ , as related to controls (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test).

**Table 2.** Effect of the Methanol Soluble Fraction (MSF) from *Cissus verticillata* and Tyramine (TYR) on the Prolongation of the Pentobarbital-Induced Sleeping Time by CCl<sub>4</sub> in Mice

| Group (mg/kg, p.o) | Sleep Latency (s)           | Sleep Duration (min)   |
|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| Control            | 261 ± 23.0 (9)              | 127 ± 11.9             |
| MSF 50             | 277 ± 31.3 (7)              | 114 ± 14.1             |
| MSF 100            | 340 ± 36.0 (7)              | 41 ± 6.6 <sup>a</sup>  |
| TYR 1              | 276 ± 33.5 (6)              | 44 ± 3.5 <sup>a</sup>  |
| TYR 2              | 382 ± 37.5 (6) <sup>a</sup> | 37 ± 4.42 <sup>a</sup> |

Animals were treated with MSF (50 e 100 mg/kg), TYR (1 e 2 mg/kg), followed by 20% CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg, s.c.), 1 h later. Twenty four hours after the CCl<sub>4</sub> injection, animals were administered with pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and evaluated for sleep latency and sleep duration. Values represent means ± SEM of the number of animals in parentheses. <sup>a</sup>p < 0.05, as related to controls (ANOVA and Student-Newman-Keuls as the *post hoc* test).

## DISCUSSION

Diabetes mellitus is characterized by hyperglycemia together with biochemical alterations of glucose and lipid peroxidation [10]. Lipid peroxidation is a free radical-related process, involved in oxidative stress which plays a major role in the pathogenesis of diabetes mellitus [33]. Abnormally high levels of lipid peroxidation and the simultaneous decline of antioxidant defense mechanisms can lead to damage of cellular organelles and subsequent oxidative stress.

Alloxan induces “chemical diabetes” in a wide variety of animal species, by damaging the insulin secreting pancreatic beta cells, at doses ranging from 40 to 200 mg/kg, (i.v. or i.p.). Although it is largely accepted that alloxan at higher doses is a model of type 1 diabetes, at a lower dose, such as that used in the present study (40 mg/kg, i.v.), it produces a type 2 diabetes, because of a residual insulin secretion [34]. Hyperglycemia increases the generation of free radicals which may lead to liver cells damage, and the increase of oxygen free radicals in diabetes could be primarily due to the increase in blood glucose levels and secondarily to the effects of alloxan [35].

In a previous work [23], we showed that the daily treatment of diabetic rats with the aqueous extract from *C. verticillata* (AECS) for 7 days (100 and 200 mg/kg, p.o.) significantly decreased blood glucose levels in 25 and 22%, respectively, as compared to the same groups before AECS treatment. While no changes were seen in total cholesterol levels, a significant decrease was observed in plasma triglyceride levels, in the alloxan-induced diabetic rats after AECS treatment with both doses, as compared to the same groups before treatment.

These results agree with recent ones [24] where we showed significant hypoglycemic and hypolipemic effects of the methanol soluble fraction (MSF) and tyramine (TYR), its main bioactive constituent, in the model of alloxan-induced diabetes in rats. MSF and TYR were also active in decreasing hepatic glycogen and glycosylated hemoglobin as well. Furthermore, both drugs protected pancreatic beta cells from alloxan toxicity. In the present study, levels of hepatic lipid peroxidation, as measured by the formation of TBARS, were not significantly altered by alloxan. Similarly, in diabetic rats

after treatment with MSF, TYR or glibenclamide, levels of TBARS were maintained unaltered, as compared to normal controls. Possibly, in our protocols, the low dose of alloxan (40 mg/kg, i.v.) leading to moderate levels of blood glucose was not sufficient to induce an increase in lipid peroxidation levels.

Abnormally high levels of lipid peroxidation and the simultaneous decline of antioxidant defense mechanisms can lead to damage of cellular organelles and subsequent oxidative stress. Recent findings indicate that the increase in the lipid peroxidation product, MDA, and the decline in glutathione-dependent antioxidant defenses may appear early in non-insulin dependent type 2 diabetes mellitus patients, before the development of secondary complications [36].

We also showed a significantly increased liver catalase activity in alloxan-induced diabetic rats, as compared to normal controls. The treatment of diabetic rats with MSF or TYR brought the enzyme activity to normal levels, and similar results were observed in the GLI treated diabetic rats. Similarly to our findings, a recent work [37] demonstrated that the catalase activity was significantly increased in the liver of alloxan-induced diabetic rabbits, and values were normalized by repaglinide, an oral antidiabetic drug. Furthermore, increased levels of catalase were observed in liver of alloxan-induced diabetic rats [38] what, according to Kakkar *et al.*, 1995 [1], is due to the oxidative stress and increased production of hydrogen peroxide caused by diabetes.

Alloxan exerts its diabetogenic effect by the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in intact islets [39]. The liver contains high superoxide dismutase (SOD), catalase, and reduced glutathione (GSH) activities which can scavenge alloxan-induced free radicals. On the contrary, islet cells have low concentrations of these enzymes, making them vulnerable to cytotoxic effects of free radicals [2]. According to Malaise *et al.*, 1982 [40], alloxan decreases the islet GSH content, as well as glucose oxidation and glucose-stimulated insulin release by pancreatic islets. These functional effects of alloxan are presumably relevant to the cytotoxic action of the drug. The activity of GSH peroxidase, an enzyme catalyzing the reduction of peroxides, was found to be much less in pancreatic islets than in other tissues [40]. These findings suggest that the selective cytotoxicity of alloxan to pancreatic beta cells result from a rapid cellular uptake of the drug and a great sensitivity to peroxide (low GSH peroxidase and catalase activities).

In the present study, levels of liver GSH decreased significantly in almost 80%, in diabetic animals, as compared to normal controls. The treatment of diabetic animals with MSF reversed the alloxan effect, and values of GSH leveled up towards normality. A similar finding was demonstrated after TYR or GLI treatments. Sailaja *et al.*, 2003 [41], reported that diabetic patients have shown increased lipid peroxidation and decreased levels of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, glutathione, and glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Diabetic rats also showed increased MDA levels, whereas antioxidant enzymes such as reduced glutathione, SOD and glutathione peroxidase were markedly diminished, in comparison to controls [42-43]. Alloxan-induced diabetic

rats presented an almost 10 times increase in nitrite levels, indicative of free radicals formation. A great reduction of TBARS levels was observed after treatment of diabetic animals with MSF, pointing out to a blockade caused by MSF in the alloxan-induced oxidative stress. The effect was even greater after treatment of diabetic animals with TYR, suggesting that *C. verticillata* has an important antioxidant activity.

It is known [44] that hyperglycemia induces an over production of oxygen radicals, and consequently increases protein and lipid oxidations in diabetic patients. These findings suggest that diabetes is an altered metabolic state of oxidation-reduction. Proteins and lipids are among the main targets for oxidative stress.

CCl<sub>4</sub> treatment decreases SOD, catalase, glutathione and glutathione peroxidase, and increases lipid peroxidation. SOD is a ubiquitous cellular enzyme that dismutates superoxide radicals to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and oxygen, and is one of the main cellular defense mechanisms. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formed by SOD and other processes is scavenged by catalase, an enzyme responsible for the dismutation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O and molecular oxygen. Glutathione is an important naturally occurring antioxidant, as it prevents hydrogen of the sulfhydryl group to be abstracted, instead of methylene hydrogen of unsaturated lipids. Therefore, levels of glutathione are of critical importance in tissue injury caused by toxic substances. The antioxidant enzymes and glutathione form the first line of defense against free radical-induced damage, offering protection against free radicals and thereby maintaining low levels of lipid peroxidase [45]. Peroxidase is an enzyme that catalyzes the reduction of hydroperoxides, including hydrogen peroxides, and functions in order to protect the cell from peroxidative damage.

It has been shown that the activation of amino oxidases, present in insulin-sensitive tissues, by tyramine induces insulin-like effects, and increases peripheral glucose utilization [21]. Tyramine stimulates glucose transport in rodent or human adipocytes through their oxidation by semicarbazide-sensitive amino oxidase (SSAO) or monoamine oxidase (MAO) [46, 47]. Furthermore, the amine-dependent stimulation of glucose transport was found to be mediated by hydrogen peroxide, generated during amine oxidation, since it was prevented by catalase, glutathione or N-acetylcysteine. In fact, hydrogen peroxide is an insulin mimicking agent that enhances glucose transport [48], stimulates lipogenesis [49] and inhibits lipolysis [50] in fat cells. These insulin-like effects seem to be mediated at least in part by tyrosine phosphorylation of intracellular proteins [51].

The sympathomimetic action of tyramine, leading to undesirable effects, talks against a possible therapeutic approach to diseases linked to glucose intolerance. However, other amines, such as benzylamine, devoid of sympathomimetic effects, like tyramine, also reduce the hyperglycemia of streptozotocin-induced diabetic rats [52]. Recently [53], tyramine and benzylamine were reported to mimic insulin action on adipose differentiation, and the stimulation of adipogenesis by these drugs was an SSAO-dependent mechanism that apparently shared common signaling pathways with insulin.

The antioxidant activity of *C. verticillata* demonstrated in the present study has been detected in extracts of other species of the genus *Cissus*, such as *C. quadrangularis* [54-56]. We assume that the antioxidant effects of MSF and tyramine on defense mechanism enzymes are, at least in part, responsible for the hypoglycemic activity of the plant as observed by us [24]. Furthermore, the effects of these drugs on the CCl<sub>4</sub>-treated rats were probably also due to their antioxidant activity, since CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity is a consequence of free radicals production [56]. In conclusion, not only the hypoglycemic but also the hypotriglyceridemic effects of *C. verticillata* are, in great part, due to the ability of this species to scavenge free radicals and to antagonize oxidative-induced tissue damages as those seen in several pathologies, including diabetes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support for this study was provided by the Brazilian National Research Council (CNPq) and the Research Foundation for Science of the State of Ceará, Brazil (FUNCAP). We thank Prof. M.O.L. Viana for the orthographic revision of the manuscript.

#### REFERENCES

- [1] Kakkur, R.; Kalra, J.; Mantha, S.V.; Prasad, K. *Mol. Cell Biochem.*, **1995**, *151*, 113.
- [2] Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Rad. Biol. Med.*, **1989**, *2*<sup>nd</sup> Ed., Oxford: Clarendon Press.
- [3] Oberley, L.W. *Free Rad. Biol. Med.*, **1988**, *5*, 113.
- [4] Barnett, A.H. *Am. J. Med.*, **1991**, *90* (Suppl. 6 A), 67.
- [5] Collier, A.; Wilson, R.; Bradley, H.; Thomson, J.A.; Small, M. *Diabetic Med.*, **1990**, *7*, 27.
- [6] Sinclair, A.J.; Girling, A.J.; Gray, L. *Gerontology*, **1992**, *38*, 268.
- [7] Ha, H.; Kim, K.H. *Kidney Int. Suppl.*, **1995**, *51*, S18.
- [8] Kedziora-Kornatowska, K.Z.; Luciak, M.; Blasszczyk, J.; Pawlak, W. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **1998**, *13*, 2829.
- [9] Nishida, T.; Nakagawa, S.; Manabe, R. *Jap. J. Ophthalmol.*, **1984**, *28*, 377.
- [10] Pari, L.; Latha, M. *Singapore Med. J.*, **2002**, *43*, 617.
- [11] Palanduz, S.; Ademoglu, E.; Gokkusu, C.; Tamer, S. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **2001**, *109*, 309.
- [12] Quilliot, D.; Walters, E.; Bonte, J.P.; Fruchart, J.C.; Duriez, P.; Ziegler, O. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, *81*, 1117.
- [13] Ndahimana, J.; Dorchy, H.; Vertongen, E.C. *Press Med.*, **1996**, *25*, 188.
- [14] Ramakrishna, V.; Jaiikhani, R. *Diagn. Pathol.*, **2007**, *2*, 22.
- [15] Engler, M.M.; Engler, M.B.; Malloy, M.J.; Chiu, E.Y.; Schloetter, M.C.; Paul, S.M.; Stuehlinger, M.; Lin, K.Y.; Cooke, J.P.; Morrow, J.D.; Ridker, P.M.; Rifai, N.; Miller, E.; Witztum, J.L.; Miettus-Snyder, M. *Circulation*, **2003**, *108*, 1059.
- [16] Tiwari, A.K. *Curr. Sci.*, **2004**, *86*, 1092.
- [17] Lizama, R.S.; Martinez, M.M.; Pérez, O.C. *Rev. Cubana Farm.*, **2000**, *34*, 2000.
- [18] Otshudi, A.L.; Foriers, A.; Vercruysse, A.; Van Zeebroeck, A.; Lauwers, S. *Phytomed.*, **2000**, *7*, 167.
- [19] Beltrame, F.L.; Sartoretto, J.L.; Bazotte, R.B.; Cuman, R.N.; Cortez, D.A.G. *Química Nova*, **2001**, *24*, 783.
- [20] Alexandre, F.S.O. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Brazil, **2007**, 206 p.
- [21] Morin, N.; Visentin, V.; Calise, D.; Marti, L.; Zorzano, A.; Testar, X.; Valet, P.; Fisher, Y.; Carpene, C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, *303*, 1238.
- [22] Visentin, V.; Prévot, D.; De Saint Front, V.D.; Morin-Cussac, N.; Thalamas, C.; Galitzky, J.; Valet, P.; Zorzano, A.; Carpène, C. *Obes. Res.*, **2004**, *12*, 547.
- [23] Viana, G.S.B.; Medeiros, A.C.C.; Lacerda, A.M.R.; Leal, L.K.A.M.; Vale, T.G.; Matos, F.J.A. *BMC Pharmacol.*, **2004**, *4*, 9.
- [24] Lino, C.S.; Sales, T. P.; Alexandre, F.S.O.; Ferreira, J.M.; Sousa, D.F.; Gomes, P.B.; Amaral, J.F.; Maia, F.D.; Silveira, E.R.; Queiroz, M.G.R.; Sousa, F.C.F.; Viana, G.S.B. *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, **2008**, (in press).

- [25] Huong, N.T.O.; Matsumoto, K.; Kasai, R.; Yamasaaki, K.; Watanabe, H. *Biol. Pharm. Bull.*, **1998**, *21*, 978.
- [26] Meister, A.; Anderson, M.E. *Ann. Rev. Biochem.*, **1983**, *52*, 711.
- [27] Ellman, G.L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, *82*, 70.
- [28] Aebi, H. *Methods Enzym. Anal.*, **1984**, *2*, 673.
- [29] Lowry, O.H.; Rosebrouh, N.J.; Farr, A.L.; Randall R.J. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *193*, 40.
- [30] Green, L.C.; Tannenbaum, S.R.; Goldman, P. *Science*, **1981**, *212*, 56.
- [31] Dandiya, P.C.; Cullumbine, H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1959**, *125*, 353.
- [32] Montilla, M.P.; Cabo, J.; Navarro, M.C.; Rico, S.; Jimenez, R.S.; Aneiros, J. *Phytother. Res.*, **1990**, *4*, 212.
- [33] Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B., 3<sup>rd</sup>. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **2003**, *17*, 24.
- [34] Srinivasan, K.; Ramarao, P. *Ind. J. Med. Res.*, **2007**, *125*, 451.
- [35] Szhudelski, T. *Physiol. Res.*, **2001**, *50*, 537.
- [36] Mahboob, M.; Rahman, M.F.; Grover, P. *Singapore Med. J.*, **2005**, *46*, 322.
- [37] Gumieniczek, A. *Acta Diabetologica*, **2005**, *42*, 75-81.
- [38] Mazzanti, C.M.; Schosler, D.R.; Filappi, A.; Prestes, D.; Balz, D.; Miron, V.; Morsch, A.; Schetinger, M.R.C.; Morsch, V.M.; Cecim, M. *Ciência Rural, Santa Maria*, **2003**, *33*, 1061.
- [39] Drews, G.; Krämer, C.; Düfer, M.; Krippeit-Drews, P. *Biochem. J.*, **2000**, *352*, 389.
- [40] Malaisse, W.J.; Malaisse-Lagae, F.; Sener, A.; Pipeleers, D.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, *79*, 927.
- [41] Sailaja, Y.R. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *35*, 133.
- [42] Kinalski, M.; Sledziwski, A.; Telejko, B.; Zarzycki, W.; Kinalski, I. *Acta Diabetol.*, **2000**, *37*, 179.
- [43] Ugochukwu, N.H.; Cobourne, M.K. *Clin. Chim. Acta*, **2003**, *336*, 73.
- [44] Kono, Y. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1978**, *86*, 189.
- [45] Enrique-Tarancon, G.; Castan, I.; Morin, N.; Marti, L.; Abella, A.; Camps, M.; Casamitjana, R.; Palancin, M.; Testar, X.; Degerman, E.; Carpené, C.; Zorzano, A. *Biochem. J.*, **2000**, *350*, 171.
- [46] Morin, N.; Lizcano, J.M.; Fontana, E.; Marti, L.; Smih, F.; Rouet, P.; Prevot, D.; Zarzano, A.; Unzeta, M.; Carpené, C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *297*, 563.
- [47] Taylor, W.M.; Halperin, M.L. *Biochem. J.*, **1979**, *178*, 381.
- [48] May, J.M.; de Haën, C. *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 9017.
- [49] Little, S.A.; De Haen, C. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 10888.
- [50] Heffetz, D.; Bushkin, I.; Dror, R.; Zick, Y. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 2896.
- [51] Marti, L.; Abella, A.; Carpené, C.; Palacin, M.; Testar, X.; Zorzano, A. *Diabetes*, **2001**, *50*, 2061.
- [52] Subra, C.; Fontana, E.; Visentin, V.; Testar, X.; Carpené, C. *J. Physiol. Biochem.*, **2003**, *59*, 209.
- [53] Chidambara-Murthy, K.N.; Vanitha, A.; Mahadeva-Swamy, M.; Ravishankar, G.A. *J. Med. Food*, **2003**, *6*, 99.
- [54] Oben, J.E.; Enyegue, D.M.; Fomekong, G.I.; Soukontoua, Y.B.; Agbor, G.A. *Lipids Health Dis.*, **2007**, *6*, 4.
- [55] Jainu, M.; Vijai, M.K.; Shyamala, C.S. *J. Ethnopharmacol.*, **2006**, *104*, 302.
- [56] Jainu, M.; Shyamala, C.S. *Afr. J. Biomed. Res.*, **2005**, *8*, 95.

Received: May 25, 2008

Revised: June 10, 2008

Accepted: June 20, 2008

© Lino *et al.*; Licensee Bentham Open.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.