



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

PAULO CARVALHO DE PAULA

**PROPRIEDADE HIPOGLICEMIANTE, HIPOCOLESTEROLÊMICA E
ANTIOXIDANTE DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam**

FORTALEZA – CEARÁ

2012

PAULO CARVALHO DE PAULA

PROPRIEDADE HIPOGLICEMIANTE, HIPOCOLESTEROLÊMICA E ANTIOXIDANTE
DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ilka Maria Vasconcelos

Co-orientadora: Dr^a. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

FORTALEZA – CEARÁ

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

P348p

Paula, Paulo Carvalho de .

Propriedade hipoglicemiante, hipocolesterolêmica e antioxidante de proteína de folhas de *Moringa oleifera* Lam / Paulo Carvalho de Paula. – 2013.

131f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

Coorientação: Prof. Dr. Daniel de Oliveira Bezerra de Souza.

1. *Moringa oleifera*. 2. Proteínas de folhas. 3. Folhas - análise. I. Título.

CDD 574.192

PAULO CARVALHO DE PAULA

PROPRIEDADE HIPOGLICEMIANTE, HIPOCOLESTEROLÊMICA E ANTIOXIDANTE
DE PROTEÍNAS DE FOLHAS DE *Moringa oleifera* Lam

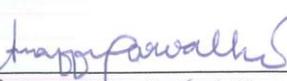
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 23/08/2012

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Ilka Maria Vasconcelos (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a. Dr.^a. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a. Dr.^a. Fernanda Maria Machado Maia
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

À Nossa Senhora de Aparecida.

À minha mãe, Maria do Socorro

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, minha fonte de inspiração e razão de minha existência, pelo dom da vida e por todas as graças a mim concedidas.

À **Nossa Senhora**, minha mãe do céu, intercessora e advogada.

À minha mãe, **Maria do Socorro**, pelo seu exemplo de fé em Deus, de garra, de perseverança, de humildade e por sua educação que me permitiu ser o homem que sou hoje. Eu te amo muito mãe!

À minha tia, **Jacinta Carvalho**, minha tia-mãe, a quem eu tanto amo, por também ter influenciado em minha formação e à sua filha, **Jamilly Carvalho**, minha prima-irmã, que mora dentro do meu coração. Amo vocês!

À **Liduína Ricarte (Lidu)**, por sua direção espiritual, por suas orações, pelo seu imenso exemplo de fé e de caráter, me mostrando que para quem crê em Deus, nada é impossível.

Aos meus amigos e irmãos de ministério Deus é mais, em especial **Júnior**, **Lávina** e os “percussivos” **Carlos Alberto (“Nando”)**, **Antônio Carlos**, **Joe**, **Isaac** e **Gil**, por entenderem minhas ausências, pela sincera amizade e pelas orações. A vocês meu muito obrigado!

Aos meus amigos **Dr. Marcelo** e sua filha **Clarissa**, pelo incentivo e pelas orientações.

À minha orientadora, **Ilka Maria Vasconcelos**, por ter me aceitado de forma tão carinhosa e gentil em seu laboratório, pela oportunidade, profissionalismo e por ter influenciado de forma significativa e decisiva em meu crescimento científico e como pessoa. Agradeço pela paciência e por tudo que a senhora fez por mim, me dando a alegria de ter conseguido chegar até aqui.

À minha co-orientadora, **Daniele Sousa**, por quem tenho grande admiração e amor, pelo exemplo, pelas risadas, pela paciência, pela ajuda nos experimentos, pelas correções e por tudo que aprendi. Espero um dia ser tão competente como você. Obrigado Dani!

À professora **Ana de Fátima**, por ter aceitado participar da banca examinadora, pelo seu exemplo como profissional e por tão gentilmente ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de grande parte dos experimentos.

À professora **Fernanda Maia**, por ter aceitado participar da banca examinadora, pelos ensinamentos e por toda a ajuda que me forneceu para conseguir ingressar no Mestrado.

À professora **Flávia Almeida**, do departamento de Farmacologia da UFC, por de forma tão calorosa ter permitido a utilização de seu laboratório para realização de alguns experimentos e à sua aluna de Doutorado **Talita Moraes**, pela imensa contribuição.

Aos meus companheiros de trabalho e queridos amigos da família LABTOX : **Adelina Braga, Henrique Pinho, Helen Costa, Lucas Pinheiro, Vanessa Duarte, Mariana Reis, Marina Gabrielle, Juliana Gifoni, Édnésio, Juscelino**, e de forma especial à **Mirella Pereira e Raquel Rocha**, duas pessoas a quem quero tanto bem. Obrigado pela força e pela ótima convivência!

À aluna de iniciação científica **Bella Giselly**, integrante do LABTOX, pela competência e imensa contribuição.

Aos meus amigos do BIOPROSPEC: **Clarissa Rocha, Terezinha Souza, Renata Maria, Gabrielle de Paula, Katharine Gurgel, Alison Rebouças, Nayana, Luiz Carlos, Jackkeline Medeiros**, pelo excelente convívio. De forma especial, a **Nathanna Matheus, Davi Farias e Martônio Viana**, por quem aprendi a ter grande estima, pela ajuda e pelas salutares sugestões.

Ao professor **Hermógenes David**, pelo exemplo de pessoa e de profissionalismo, por todas as sugestões e ensinamentos, e aos seus orientandos **Hélio Job, Andréa Costa e Raquel Coelho**, pela amizade e contribuições.

Aos amigos do laboratório de Proteínas de defesa de Plantas: **Pedro Filho, Fredy, Anna Lídia, Darcy, Rodolpho, Ana Luiza, Roberta Laiz**, pela amizade, acolhimento e por toda colaboração nos experimentos.

Aos amigos do DBBM: **Camila, Nila, Ana Karla, Adilton, Raquel** e muitos outros, que de alguma maneira deram suas contribuições.

Aos professores do DBBM, em especial **José Tadeu, Dirce Fernandes, Enéas Gomes, José Hélio, Norma Maria**, e **Ana Lúcia**, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na execução desse trabalho.

MUITO OBRIGADO!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Os trabalhos experimentais que compõem esta dissertação foram realizados com o apoio dos seguintes Programas/Instituições:

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais-LABTOX**, sob a coordenação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (FUNCAP) – Através da concessão de bolsa de Pós-Graduação ao autor deste trabalho.

DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO: CNPq e CAPES, que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga das conquistas.”

(Bill Gates)

RESUMO

Moringa oleifera Lam. é uma planta nativa do nordeste da Índia muito utilizada na medicina popular devido às suas várias propriedades farmacológicas. Estudos etnofarmacológicos têm demonstrado atividade hipoglicemiante de compostos oriundos de partes dessa planta, principalmente de suas folhas, em modelos de animais diabéticos e, também, em humanos, embasando sua utilização na medicina popular para o tratamento do diabetes. A ação hipoglicemiante de compostos de folhas de *M. oleifera* tem sido creditada a componentes oriundos do metabolismo secundário vegetal, sendo escassos trabalhos abordando a participação de proteínas nessa ação farmacológica. O objetivo deste trabalho foi obter uma fração proteica a partir de folhas de *M. oleifera* e verificar seu efeito hipoglicemiante em modelos de animais diabéticos. Para isso, foi realizada extração de proteínas a partir de folhas de *M. oleifera*, seguida de precipitação com sulfato de amônio (0-90%). Após diálise exaustiva, o material foi liofilizado para obtenção da fração proteica denominada *Mo*-FPF. Como modelo de animal experimental, foram utilizados camundongos com diabetes quimicamente induzido por aloxano. Inicialmente, doses de 100, 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo de *Mo*-FPF foram administradas intraperitonealmente, tendo sido a dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo a mais efetiva na redução glicêmica após 1, 3 e 5 horas da administração. Tal efeito hipoglicemiante não foi verificado pela rota intragástrica. Além disso, esse efeito sofreu redução quando *Mo*-FPF foi previamente fervida e administrada por via intraperitoneal. *Mo*-FPF, administrada diariamente pela rota intraperitoneal, na dose de 500 mg/Kg, durante 20 dias, resultou em redução glicêmica, além de ter exercido efeito hipocolesterolemia e antioxidante. O perfil eletroforético de *Mo*-FPF mostrou uma diversidade de bandas proteicas, que foram suscetíveis à ação da pepsina e tripsina em ensaio de digestibilidade *in vitro*. Através de imunoenensaio por *Dot Blot*, foi verificada reação cruzada entre o anticorpo anti-insulina humana e *Mo*-FPF, sugerindo a existência de epítomos antigênicos do tipo insulina em proteínas de folhas de *M. oleifera*. Assim, o conjunto de dados obtidos mostra que proteínas oriundas de folhas de *M. oleifera* contribuem para o efeito hipoglicemiante demonstrado neste trabalho.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*. Proteínas de folhas. Proteínas do tipo insulina. Atividade hipoglicemiante. Atividade hipocolesterolemia. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Moringa oleifera is a plant native to northeastern India widely used in Indian folk medicine due to its various pharmacological properties. Ethnopharmacological studies have demonstrated that compounds derived from parts of this plant, especially leaves, have hypoglycemic activity in diabetic animal models and in humans, allowing its use in folk medicine. The hypoglycemic action of *M. oleifera* leaves has been attributed to compounds from plant secondary metabolism, however studies showing the involvement of proteins as antidiabetic substances are scarce. The aim of this study was to obtain a protein fraction of *M. oleifera* leaves and evaluate its hypoglycemic effects on diabetic animal models. For this, the leaf proteins were extracted followed by ammonium sulfate precipitation (0-90%). After exhaustive dialysis, this material was lyophilized to obtain the protein fraction named *Mo*-PFL. As experimental animal model, alloxan-induced diabetic mice were used. Initially *Mo*-PFL was intraperitoneally administered at doses of 100, 300 and 500 mg/Kg body weight. The dose of 500 mg/Kg body weight was more effective in reducing blood glucose after 1, 3 and 5 hours of *Mo*-PFL administration. This hypoglycemic effect was not observed by the intragastric route. This effect was also reduced when boiled *Mo*-PFL was intraperitoneally administered. Daily intraperitoneal administration of *Mo*-PFL at a dose of 500 mg/Kg body weight for 20 days caused a significant reduction in blood glucose level and also exerted antioxidant and hypocholesterolemic effects. Electrophoretic pattern of *Mo*-PFL showed a variety of protein bands, which were susceptible to *in vitro* pepsin and trypsin digestion. A Dot Blot immunoassay showed cross reactivity between human anti-insulin antibody and *Mo*-PFL, suggesting the presence of insulin-like epitopes in *M. oleifera* leaf protein. Overall, these data show that some proteins derived from *M. oleifera* leaves may contribute to the hypoglycemic effect observed in the present work.

Keywords: *Moringa oleifera*. Leaf proteins. Insulin-like proteins. Hypoglycemic activity. Hypocholesterolemic activity. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da molécula de pró-insulina.....	22
Figura 2 - Estrutura química das moléculas de aloxano e estreptozotocina.....	40
Figura 3 - <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	47
Figura 4 - Fluxograma de obtenção do extrato total e da fração proteica 0-90% (<i>Mo</i> -FPF) a partir de folhas de <i>Moringa oleifera</i>	54
Figura 5 - Sequencia de procedimentos executados diariamente durante o período de adaptação (10-12 dias) dos animais para posterior realização dos experimentos.....	60
Figura 6 - Etapas utilizadas para indução química de diabetes por aloxano em camundongos.....	61
Figura 7 – Perfil da eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (<i>Mo</i> -FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na ausência e presença de β -mercaptoetanol 1%.....	69
Figura 8 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) da fração protéica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (<i>Mo</i> -FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%) e submetida à digestão enzimática com pepsina.....	71
Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) da fração protéica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (<i>Mo</i> -FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%) e submetida à digestão enzimática com tripsina.....	72
Figura 10 - Atividade peroxidásica dependente de guaicol (POX) da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (<i>Mo</i> -FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	74
Figura 11 - Atividade peroxidásica dependente de ascorbato (APX) da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (<i>Mo</i> -FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	75
Figura 12 - Atividade catalásica (CAT) da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (<i>Mo</i> -FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	76

Figura 13 - <i>Dot Blot</i> realizado para detecção de proteínas do tipo insulina na fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	78
Figura 14 – Efeito da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na glicemia de animais diabéticos	79
Figura 15 - Percentual de aumento ou redução glicêmica da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), quando administrada intraperitonealmente, nas doses de 100, 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo, em camundongos diabéticos, em relação à glicemia mensurada antes do tratamento (t = 0 h).....	80
Figura 16 - Efeito da administração intragástrica da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, na glicemia de camundongos diabéticos.....	81
Figura 17 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), previamente fervida por 1 hora, na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a glicemia de animais diabéticos.....	82
Figura 18 - Efeito do tratamento diário da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), durante 20 dias, na glicemia de camundongos diabéticos.....	85
Figura 19 – Percentual de aumento ou redução das glicemias, em relação à glicemia inicial, mensurada antes da administração da primeira dose dos tratamentos, ao longo dos 20 dias de tratamento com a fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, em camundongos diabéticos	86
Figura 20 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a ingestão hídrica de camundongos diabéticos no período de 24 horas e ao longo de 20 dias de tratamento.....	87

Figura 21 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na taxa de micção, em 24 horas, verificado pela observação visual da umidade das maravalhas.....	88
Figura 22 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a massa corpórea de camundongos diabéticos ao longo de 20 dias de tratamento.....	89
Figura 23 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre os níveis hepáticos de malondialdeído, uma espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico, em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos ao final dos 20 dias de experimento.....	92
Figura 24 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a atividade de catalase hepática em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos ao final dos 20 dias de experimento.....	93
Figura 25 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, nos níveis de superóxido dismutase em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos ao final dos 20 dias de experimento.....	94
Figura 26 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, nos níveis totais de nitrito/nitrato em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos ao final dos 20 dias de experimento.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de diabetes por região e a nível mundial entre adultos de 20-79 anos em 2010 e prevalência estimada para 2030.....	25
Tabela 2 - Critérios para o diagnóstico de diabetes.....	27
Tabela 3 - Preparações de insulina e antidiabéticos orais disponíveis no mercado....	36
Tabela 4 - Proteínas solúveis presentes nos extratos totais obtidos com diferentes tampões e tempos de extração.....	67
Tabela 5 - Teor de proteínas e rendimento proteico ao longo das etapas de obtenção da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF).....	68
Tabela 6 - Determinação de atividade hemaglutinante da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-PFL), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	73
Tabela 7 - Concentrações de lipídeos e lipoproteínas séricas em camundongos (n = 12) após 20 dias de administração intraperitoneal de doses repetidas (500 mg/Kg de peso corpóreo) da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	90
Tabela 8 - Níveis séricos em camundongos (n = 12) de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina, proteínas totais e albumina após 20 dias de administração intraperitoneal de doses repetidas (500 mg/Kg de peso corpóreo) da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%).....	91
Tabela 9 - Investigação de toxicidade aguda decorrente da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i> (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 2500 mg/Kg de peso corpóreo.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	Produtos finais de glicosilação avançada
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APX	Peroxidase dependente de ascorbato
AST	Aspartato aminotransferase
BB	<i>BioBreeding</i>
BCIP	5- bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
ConA	Concanavalina A
DL₅₀	Dose letal média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
FA	Fosfatase alcalina
GAD65	ácido glutâmico descarboxilase isoforma 65
GLUT	Transportador de glucose
HbA1c	Hemoglobina glicada do tipo A1c
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HLA	Antígeno leucocitário humano
IA-2	Tirosina fosfatase associada à insulinoma isoforma 2
IgG	Imunoglobulina G
IL2RA	Cadeia A do receptor de interleucina-2
IM-9	Linfócito B derivado de mieloma múltiplo humano
INS-VNTR	Número variável de repetições em <i>tandem</i> do gene da insulina
KK	<i>Kuo Kondo</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malondialdeído
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
Mo-FPF	Fração proteica de folhas de <i>Moringa oleifera</i>
NBT	Azul de nitro tetrazólio

NO	Óxido nítrico
NOD	<i>non-obese diabetic</i>
NZO	<i>New Zealand Obese</i>
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PHA	Fitohemaglutinina
PKC	Proteína quinase C
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluorido
POX	Peroxidase de fenóis
PTPN22	Proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PVP	Polivinilpirrolidona
RAGE	Receptor de produto final de glicosilação avançada
RNA^m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema único de saúde
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBS-T	Tampão tris-salina contendo Tween
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletlenodiamina
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
UH	Unidades de hemaglutinação
UI	Unidades internacionais
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
ZnT8	Transportador de zinco isoforma 8

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.	Célula β pancreática: da biossíntese à secreção de insulina	20
2.2.	Diabetes <i>mellitus</i>	24
2.2.1.	<i>Descrições, critérios de diagnóstico e aspectos epidemiológicos</i>	24
2.2.2.	<i>Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2</i>	26
2.2.3.	<i>Alterações metabólicas no diabetes</i>	31
2.2.4.	<i>Complicações crônicas do diabetes mellitus</i>	33
2.2.5.	<i>Aspectos terapêuticos do diabetes</i>	34
2.3.	Modelos animais de diabetes <i>mellitus</i>	35
2.4.	Efeito hipoglicemiante de plantas	41
2.5.	Proteínas vegetais como potencial fonte hipoglicemiante	43
2.6.	<i>Moringa oleifera</i>	45
3.	OBJETIVOS	49
3.1.	Geral	49
3.2.	Específicos	49
4.	MATERIAIS	50
4.1.	Material Vegetal	50
4.2.	Eritrócitos	50
4.3.	Animais	50
4.4.	Reagentes químicos	50
5.	MÉTODOS	52
5.1.	Obtenção de proteínas a partir de folhas de <i>Moringa oleifera</i>	52
5.1.1.	<i>Preparação da farinha</i>	52
5.1.2.	<i>Seleção do tampão de extração</i>	52
5.1.3.	<i>Dosagem de proteínas solúveis</i>	52
5.1.4.	<i>Obtenção da fração proteica</i>	53
5.1.5.	<i>Determinação de proteínas totais</i>	53
5.2.	Caracterização bioquímica da Mo-FPF	55

5.2.1.	<i>Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida</i>	55
5.2.2.	<i>Digestibilidade in vitro de Mo-FPF</i>	55
5.2.3.	<i>Determinação de atividade hemaglutinante</i>	56
5.2.4.	<i>Determinação de atividades antioxidantes in vitro de Mo-FPF</i>	57
5.2.4.1.	<i>Determinação de atividade peroxidásica dependente de fenóis (POX)</i>	57
5.2.4.2.	<i>Determinação de atividade peroxidásica dependente de ascorbato (APX)</i>	57
5.2.4.3.	<i>Determinação de atividade catalásica (CAT)</i>	57
5.2.5.	<i>Dot Blot</i>	58
5.3.	Ensaio <i>in vivo</i> para verificação de efeito hipoglicemiante de Mo-FPF	58
5.3.1.	<i>Adaptação dos animais</i>	58
5.3.2.	<i>Indução de diabetes experimental</i>	59
5.3.3.	<i>Prospecção de efeito hipoglicemiante – teste de dose única</i>	59
5.3.4.	<i>Avaliação da natureza proteica do efeito hipoglicemiante</i>	62
5.3.5.	<i>Teste de doses repetidas</i>	62
5.3.6.	<i>Determinação do estado oxidativo hepático</i>	63
5.3.6.1.	<i>Determinação de peroxidação lipídica</i>	63
5.3.6.2.	<i>Determinação de superóxido dismutase</i>	63
5.3.6.3.	<i>Determinação de catalase</i>	64
5.3.6.4.	<i>Determinação de óxido nítrico</i>	64
5.4.	Toxicidade aguda	64
5.5.	Análise estatística	65
6.	RESULTADOS	66
6.1.	Obtenção de proteínas a partir de folhas de <i>M. oleifera</i>	66
6.2.	Caracterização bioquímica de Mo-FPF	66
6.3.	Ensaio <i>in vivo</i> para verificação de efeito hipoglicemiante da Mo-FPF	77
6.4.	Toxicidade aguda	96
7.	DISCUSSÃO	98
8.	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as doenças do tipo crônicas não transmissíveis constituem a principal causa de morte e invalidez, tendo sido estimado que, em 2020, 80% das doenças nos países em desenvolvimento deverão advir de problemas crônicos. O diabetes *mellitus* e suas complicações tardias representam uma das principais enfermidades crônicas que contribuem para tais impactos (CHOPRA; GALBRAITH; DARNTON-HILL, 2002; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). Tomando-se como referência que em 2000 existiam cerca de 170 milhões de diabéticos no mundo e que até 2030 está previsto um aumento para 439 milhões (no Brasil, espera-se algo em torno de 12 milhões de diabéticos), percebe-se um avanço dessa doença em proporções epidêmicas (WILD *et al.*, 2004; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

Uma vez que o diabetes não tem cura, o seguimento de uma rotina de cuidados medicamentosos, dietéticos e de estilo de vida deve ser estritamente constante para a manutenção de níveis glicêmicos adequados. A falta de adesão ao tratamento é uma das principais causas do controle inadequado e do aumento de complicações associadas à doença (LEU; ZONSZEIN, 2009). Entretanto, perspectivas de tratamento do diabetes, tais como a formulação de novos análogos de insulina e de hipoglicemiantes orais, garantem, quando acessíveis, maiores possibilidades de contribuição para redução glicêmica e conforto por parte do paciente, o qual pode aderir de forma mais eficiente ao tratamento, resultando em um maior controle, na redução de comorbidades e no alívio dos impactos dessa doença no âmbito social e econômico (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

Diversas pesquisas conduzidas com animais relatam efeitos hipoglicêmicos de extratos de plantas, distribuídas nas mais diversas famílias do reino Plantae. Vários componentes extraídos mostraram-se capazes de reduzir ou amenizar a sintomatologia do diabetes e de suas complicações. O maior crédito desses efeitos antidiabéticos de tecidos vegetais tem sido dado aos compostos secundários, muito embora proteínas venham revelando forte potencial para serem usadas como agentes hipoglicemiantes. A descoberta, isolamento e caracterização estrutural de componentes vegetais com tais propriedades benéficas, sejam eles de que natureza (protéica, glicídica, oriundos do metabolismo secundário vegetal), possibilita, por exemplo, a formulação de novos medicamentos, além de incentivar a busca de tais componentes em outras fontes (NEGRI, 2005; MENTREDDY, 2007).

Moringa oleifera, chamada simplesmente de moringa e conhecida em muitas regiões como “a árvore da vida”, é utilizada como fonte de alimento e, também, como coadjuvante no

tratamento de diversas doenças, inclusive no diabetes (ANWAR *et al.*, 2007). Pesquisas têm mostrado seu potencial hipoglicemiante, especialmente de suas folhas (NDONG *et al.*, 2007; JAISWAL *et al.*, 2009). Todavia, até a presente data, não há relatos na literatura abordando especificamente o efeito hipoglicemiante de proteínas de moringa. Uma vez que essas macromoléculas estão universalmente presentes em todos os seres, havendo, inclusive, evidências científicas da conservação de proteínas com atividade do tipo insulina (*insulin-like*) em plantas (SILVA *et al.*, 2002, VENÂNCIO *et al.*, 2003) e, ainda, que folhas de moringa apresentam elevados teores proteicos (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; MOURA *et al.*, 2009), o seguinte questionamento surgiu:

As proteínas presentes nas folhas de moringa seriam responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade hipoglicemiante relatada para esta espécie vegetal?

Diante desse questionamento, o presente trabalho teve como proposta avaliar os efeitos hipoglicemiantes de extratos proteicos de folhas de moringa, em modelos de animais diabéticos, de forma a contribuir para a elucidação das propriedades e possibilidades adicionais de aplicação dessas proteínas como agentes terapêuticos no tratamento do diabetes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Célula β pancreática: da biossíntese à secreção de insulina

O pâncreas constitui um órgão de fundamental importância para a homeostase metabólica da glucose, sendo tal função realizada, em grande parte, pelo compartimento endócrino pancreático, constituído por inúmeros e pequenos grupos de células endócrinas, as ilhotas pancreáticas, distribuídas ao longo de todo o tecido acinar desse órgão (BRASS *et al.*, 2009). As ilhotas pancreáticas perfazem cerca de 2 a 3% do volume pancreático, compreendendo diversos tipos de células endócrinas, destacando-se as células β (produtoras de insulina), as células α (produtoras de glucagon), as células δ (produtoras de somatostatina), as células produtoras de polipeptídeo pancreático e, descobertas mais recentemente, as células produtoras de grelina (WIERUP *et al.*, 2002; JONES; PERSAUD, 2010).

As ilhotas pancreáticas são aproximadamente esféricas, com um diâmetro médio de 100 a 200 μm , podendo contabilizar mais de um milhão em um pâncreas humano saudável. Entre espécies, existem algumas diferenças no arranjo anatômico das células nas ilhotas. Em camundongos, por exemplo, a população de células β constitui cerca de 80% da massa de células endócrinas e ocupam o centro da ilhota, sendo rodeadas por uma fina camada de células α . Em humanos e em primatas não humanos, as células β perfazem de 50 a 60% da massa de células endócrinas e a estrutura da ilhota é menos organizada, havendo certa mistura entre células β e α ao longo de toda a ilhota. Além disso, ilhotas humanas possuem mais células α e menos células β , quando comparadas com ilhotas de camundongos (CABRERA *et al.*, 2006; BRISSOVA; POWERS, 2008).

As células β produzem o hormônio insulina, o hormônio anabólico mais importante para o controle da homeostase metabólica normal em mamíferos. O *turnover* de células β adultas é um processo lento, no qual somente 1% dessas células sai da fase G_0 do ciclo mitótico (SKELIN; RUPNIK; CENCIC, 2010). Ainda assim, a replicação mitótica é a principal forma de aumento da população dessas células. Fatores regulatórios do ciclo celular, tais como ciclina D2 e ciclina D dependente de quinase-4, são essenciais para a replicação normal das células β , especialmente na fase neonatal, na qual ocorre a maior taxa de replicação que, por sua vez, garante uma massa adequada dessas células na fase adulta (LINGOHR; BUETTNER; RHODES, 2002; BOUWENS; ROOMAN, 2005; SALPETER; DOR, 2008). A neogênese de células β , ou seja, a formação de novas células β a partir de células epiteliais do duto pancreático tem sido documentada em ratos e em humanos, tendo

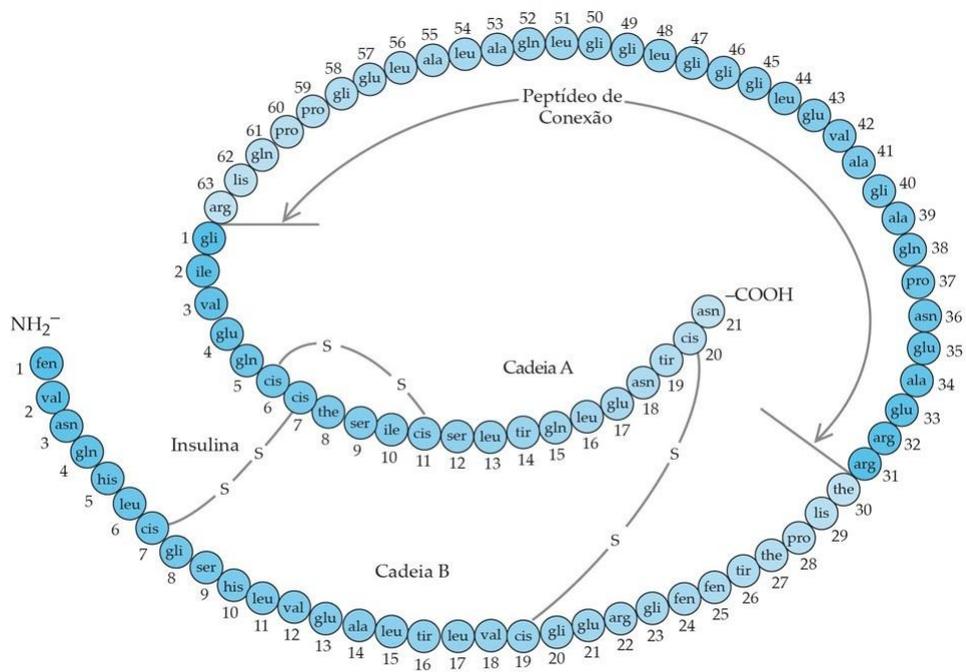
sido sugerido a não ocorrência em camundongos. Embora seja aceito que essa neogênese provavelmente ocorra, seus mecanismos bioquímicos são ainda pouco compreendidos. Na fase adulta, a massa de células β permanece relativamente constante, aumentando sob certas circunstâncias fisiológicas tais como gravidez e obesidade não diabética (BONNER-WEIR, 2000; BUTLER *et al.*, 2003; DOR *et al.*, 2004; LEVETAN, 2010).

Níveis adequados de glucose sanguínea (normoglicemia) são alcançados graças à atuação de um sistema neuro-hormonal regulatório/contraregulatório, do qual a insulina e, conseqüentemente, as células β , participam. Reduções glicêmicas para menos que 70 mg/dL suprimem a liberação de insulina pelas células β , disparando, por sua vez, a liberação de hormônios hiperglicemiantes por outras células, a fim de restaurar a normoglicemia. Aumentos glicêmicos acima dos níveis normais estimulam a liberação de insulina, que promove remoção do excesso de glucose sanguínea por células musculares esqueléticas e adipócitos. As células β são altamente especializadas na produção e estocagem de insulina, de tal forma que esse hormônio constitui cerca de 10% das proteínas totais encontradas nessas células (SHRAYYEF; GERICH, 2009; JONES; PERSAUD, 2010).

A insulina foi a primeira proteína cuja estrutura primária foi elucidada (SANGER, 1959). A biossíntese desse hormônio pelas células β envolve a síntese inicial de um precursor polipeptídico, a pré-pró-insulina, constituído por um peptídeo sinal de 24 resíduos, uma cadeia A de 21 resíduos, o peptídeo C (cujo comprimento varia entre espécies) e uma cadeia B de 30 resíduos. O gene para esse precursor está localizado no braço curto do cromossomo 11. A tradução do RNAm maduro da pré-pró-insulina é realizada no retículo endoplasmático rugoso, em cujas cisternas a pré-pró-insulina é lançada e rapidamente processada por enzimas proteolíticas que clivam o peptídeo sinal, gerando pró-insulina (RHODES; SHOELSON; HALBAN, 2005; STEINER, 2008)

As conformações estruturais das moléculas de pró-insulina e de insulina são muito similares, e a principal função do peptídeo C na pró-insulina é alinhar as pontes dissulfeto que ligam as cadeias A e B, de forma que a molécula sofra enovelamento de forma correta para posterior clivagem (FIGURA 1). Moléculas de pró-insulina são transferidas ao aparelho de Golgi, no qual são empacotadas em vesículas de secreção. A conversão de pró-insulina a insulina consiste na remoção do peptídeo C e dos dipeptídeos básicos que unem as extremidades do peptídeo C às cadeias A e B, pela ação sequencial de duas peptidases (pró-hormônio convertase 2 e pró-hormônio convertase 3) e da carboxipeptidase H, liberando peptídeo C e insulina. Esse processamento lítico da pró-insulina inicia no aparelho de Golgi e continua nas vesículas de secreção em maturação formadas a partir dessa organela, nas quais a

FIGURA 1 – Estrutura da molécula de pró-insulina.



Fonte: GENUTH, 2008.

insulina (e o peptídeo C) permanece estocada até o surgimento de um estímulo secretório (RHODES, SHOELSON; HALBAN, 2005; JONES; PERSAUD, 2010).

Níveis circulantes de insulina são ajustados à situação metabólica existente e a sua secreção pelas células β é regulada tanto por nutrientes como por fatores não nutrientes, tais como substâncias derivadas das ilhotas pancreáticas, hormônios gastrintestinais, peptídeos biologicamente ativos e neurotransmissores. Contudo, o principal determinante da secreção de insulina é a concentração circulante de glucose (JONES; PERSAUD, 2010). A curva dose-resposta de liberação de insulina induzida por glucose tem um padrão sigmoidal, com rápida e transiente liberação de insulina acima dos níveis basais (1ª fase de liberação) nos primeiros minutos, seguida por uma liberação constante e prolongada nos minutos seguintes (2ª fase de liberação). Esse perfil de secreção bifásica é observado *in vivo* e *in vitro*, após um estímulo de uma carga de glucose, sugerindo que tal propriedade é intrínseca de células β pancreáticas (STRAUB; SHARP, 2004).

O acoplamento entre as concentrações de glucose e o estímulo para secreção de insulina é feito pela enzima glucoquinase, que funciona como um sensor glicêmico. A glucose é transportada para o interior das células β através de transportadores (GLUTs) localizados na membrana, os quais favorecem um rápido equilíbrio das concentrações intra e extracelulares de glucose. Em roedores, a principal isoforma presente na célula β é a GLUT2, enquanto que em humanos existem as isoformas GLUT1, GLUT2 e GLUT3 (DE VOS *et al.*, 1995; GUILAM; DUPRAZ; THORENS, 2000; RICHARDSON *et al.*, 2007). A ação da glucoquinase gera aumentos dos níveis de ATP intracelular, os quais promovem o fechamento dos canais de potássio sensíveis ao ATP (canais K_{ATP}) que, sob circunstâncias normoglicêmicas, permanecem abertos, favorecendo o efluxo de K^+ e o equilíbrio do potencial de membrana. Tal fechamento reduz esse efluxo e dispara a despolarização que, por sua vez, promove a abertura de canais de cálcio dependente de voltagem, o que intensifica o influxo de cálcio. O cálcio intracelular promove a exocitose dos grânulos de insulina, acoplando, portanto, a despolarização com a resposta secretória (BARG *et al.*, 2001; JONES; PERSAUD, 2010).

Uma vez secretada, a insulina irá atuar em uma variedade de tecidos, ligando-se a receptores heterotetraméricos e ativando certas vias de sinalização. No que diz respeito ao metabolismo da glucose, essas vias ativadas promovem um aumento do transporte desse monossacarídeo por receptores do tipo GLUT4, presentes particularmente no músculo estriado esquelético e nos adipócitos, promovendo, também, uma maior utilização da glucose nas rotas glicolítica e de síntese de glicogênio. A insulina aumenta essa taxa de transporte por

estimular a translocação de vesículas contendo GLUT4 à membrana, bem como por aumentar a taxa de exocitose e de incorporação do receptor à membrana (CIARALDI, 2009; HARVEY; FERRIER, 2011).

2.2. Diabetes mellitus

2.2.1. Descrições, critérios de diagnóstico e aspectos epidemiológicos

O diabetes *mellitus* constitui um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por níveis glicêmicos elevados (hiperglicemia), resultantes de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos. O estado hiperglicêmico persistente pode, em longo prazo, resultar em alterações patológicas de diversos órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. Atualmente, o diabetes é a principal causa de cegueira, amputação de membros inferiores e uma das principais causas de insuficiência renal crônica, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, consequências essas causadas por lesões macro e microvasculares relacionadas à hiperglicemia. O diabetes, portanto, trata-se de uma condição que requer intensos cuidados e suportes terapêuticos e boa adesão por parte do paciente ao tratamento, a fim de prevenir ou retardar o aparecimento das complicações relacionadas à hiperglicemia (HARVEY; FERRIER, 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

A sintomatologia do diabetes inclui três sintomas clássicos: sede intensa (polidipsia), poliúria (aumento do volume urinário e da frequência de micção) e polifagia. Outros sintomas incluem visão borrada, cansaço excessivo, perda de peso acentuada, vômito, fraqueza, desidratação e infecções. Em casos mais severos, pode haver o desenvolvimento de cetoacidose ou síndrome hiperosmolar, que consistem em complicações agudas caracterizadas por acidose metabólica e aumento significativo da osmolaridade sérica, respectivamente, condições que podem evoluir para coma e morte (EKOÉ; ZIMMET; YALE, 2008)

O avanço do diabetes em todo o mundo ocorre em proporções epidêmicas e preocupa organizações governamentais de saúde, tendo em vista a morbi-mortalidade ocasionada por essa condição. Em termos mundiais, em 1985, cerca de 30 milhões de indivíduos apresentavam diabetes, subindo para 170 milhões em 2000 e para 285 milhões em 2010, com projeções de 439 milhões de indivíduos diabéticos em 2030 (BARCELÓ *et al.*, 2003; WILD *et al.*, 2004; SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010) (TABELA 1). No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) tem atendido, desde 1994, um crescente número de indivíduos portadores da

TABELA 1 – Prevalência de diabetes por região e a nível mundial entre adultos de 20-79 anos em 2010 e prevalência estimada para 2030

	2010		2030	
	Número (10 ⁶)	Prevalência (%)	Número (10 ⁶)	Prevalência (%)
África	12,1	3,8	23,9	4,7
Oriente Médio	26,6	9,3	51,7	10,8
Europa	55,4	6,9	66,5	8,1
América do Norte	37,4	10,2	53,2	12,1
América do Sul e Central	18,0	6,6	29,6	7,8
Sul da Ásia	58,7	7,6	101,0	9,1
Pacífico Ocidental	76,7	4,7	112,8	5,7
Mundo	284,8	6,4	438,7	7,7

Fonte: SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010

doença. Em 2000, por exemplo, o número médio de atendimentos foi de 1,48 milhões e em 2004 esse número aumentou para 5,86 milhões (FERREIRA, 2011).

Em termos de saúde pública, os custos diretos e indiretos da assistência à saúde da população diabética aumentam em virtude de procedimentos tais como hospitalização, hemodiálise, invalidez, absenteísmo, cirurgia e morte prematura, principalmente quando não se tem uma política adequada de educação em diabetes para se tentar reduzir as complicações da doença no decurso do tempo. Assim, medidas profiláticas são de grande valia na minimização do impacto econômico do tratamento do diabetes (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1995; BARCELÓ *et al.*, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

Métodos laboratoriais de diagnóstico de diabetes e que têm sido utilizados por décadas são a glicemia de jejum e o teste oral de tolerância à glucose. Atualmente, os critérios de diagnóstico se baseiam nas seguintes condições: (1) glicemia de jejum, cujos valores glicêmicos de diagnóstico são maiores ou iguais a 126 mg/dL; (2) hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$; (3) glicemia pós-prandial ≥ 200 mg/dL, verificada duas horas após o início do teste oral de tolerância à glucose e (4) glicemia em qualquer momento ≥ 200 mg/dL em pacientes com sintomas de hiperglicemia (TABELA 2). Além disso, existem os critérios do estado pré-diabético, uma condição que aumenta o risco para o desenvolvimento de um diabetes clínico. Seguindo as diretrizes atuais, indivíduos normais apresentariam valores de glicemia de jejum ≤ 99 mg/dL, glicemias ≤ 139 mg/dL no teste oral de tolerância à glucose e hemoglobina glicada $\leq 5,4\%$. Valores entre os limites da normalidade e do diagnóstico de diabetes categorizam o estado de pré-diabetes (AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS, 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

2.2.2. Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2

Os principais tipos clínicos de diabetes são o diabetes tipo 1 e o tipo 2. O diabetes tipo 1 é caracterizado por uma deficiência absoluta de insulina, ocasionada pela destruição das células β , que pode ser de natureza idiopática ou, na maioria das vezes, autoimune. Os sintomas aparecem de forma abrupta quando 80-90% das células β do pâncreas foram destruídas. Já no diabetes tipo 2, existe uma deficiência relativa de insulina por conta de uma disfunção das células β acoplada à resistência tecidual à ação da insulina, frequentemente observada em indivíduos obesos. Nesse tipo de diabetes, os sintomas muitas vezes não são evidentes, tendo uma evolução silenciosa, sendo a doença frequentemente detectada em

TABELA 2 – Critérios para o diagnóstico de diabetes.

Parâmetros bioquímicos
Hemoglobina A1C \geq 6,5%
Glicemia de jejum \geq 126 mg/Dl
Glicemia pós-prandial \geq 200 mg/dL após 2 h do Teste Oral de Tolerância à Glucose
Glicemia \geq 200 mg/dL a qualquer momento, em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia

Fonte: AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012.

exames laboratoriais de rotina (WATKINS *et al.*, 2003; HARVEY; FERRIER, 2011). Outros tipos clínicos de diabetes incluem o diabetes gestacional, defeitos genéticos da secreção de insulina, defeitos genéticos da ação da insulina, endocrinopatias, diabetes quimicamente induzido, diabetes induzido por infecções e síndromes genéticas associadas com diabetes (RHODES; SHOELSON; HALBAN, 2005).

O diabetes *mellitus* tipo 1 abrange cerca de 5 a 10% dos casos, podendo apresentar etiologia genética, ambiental ou, mais provavelmente, etiologia associada a complexas interações entre genes e ambiente. A suscetibilidade genética aumenta a predisposição de respostas autoimunes destruidoras de células β , e as taxas de destruição são muito variáveis, sendo mais rápida em crianças e mais lenta em adultos. Dessa forma, crianças e adolescentes apresentam hiperglicemia severa nas manifestações iniciais da doença, enquanto que adultos podem reter células β funcionantes, as quais previnem, durante anos, consequências patológicas agudas resultantes de níveis glicêmicos muito elevados (DELLI *et al.*, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

O risco de diabetes tipo 1 é aumentado na existência de histórico familiar da doença: filhos apresentam risco de 2% se a mãe tem diabetes, aumentando para 7% se o pai apresentar a doença e para 30% se ambos forem diabéticos. A taxa de concordância de diabetes entre gêmeos monozigóticos varia de 30 a 65%, enquanto que entre gêmeos dizigóticos essa taxa cai para 6 a 10% (ALI, 2009; DELLI *et al.*, 2010). A predisposição genética ao diabetes tipo 1 é associada à região genômica do sistema de histocompatibilidade principal (MHC), que em humanos, é denominada HLA (antígeno leucocitário humano), contendo vários genes relacionados ao sistema imune. Genes HLA de classe II, presentes na banda 21 do braço curto do cromossomo 6 são os mais fortemente associados ao risco de diabetes tipo 1, com os haplotipos DR3-DQ2 e DR4-DQ8 proporcionando genótipos heterozigóticos de maiores riscos. Outras regiões cromossômicas fortemente associadas ao risco aumentado de diabetes tipo 1, porém com menor contribuição do que os haplotipos HLA de alto risco incluem os genes INS-VNTR, PTPN22 e IL2RA (CD25), localizados nos cromossomos 11, 1 e 10, respectivamente (NOBLE *et al.*, 1996; HERMANN *et al.*, 2004; THOMSON *et al.*, 2007; TODD *et al.*, 2007).

A autoimunidade no diabetes tipo 1 resulta de mecanismos celulares e humorais dirigidos especificamente contra as células β , resultando na destruição progressiva dessas células. Essa destruição é principalmente mediada por autoimunidade celular, envolvendo a infiltração das ilhotas pancreáticas por linfócitos T e B, macrófagos e células matadoras naturais, levando à insulite (HANNINEN *et al.*, 1992; MALLONE; ENDERT, 2008). A

produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos presentes no infiltrado celular pode danificar as células β diretamente, ou o pode fazer indiretamente, através da ativação de linfócitos T e B (MORRAN; MCINERNEY; PIETROPAOLO, 2008).

O desenvolvimento de autoimunidade no diabetes tipo 1 é associado ao aparecimento de vários autoanticorpos, constituindo marcadores bioquímicos para a presença de autoimunidade durante a fase pré-clínica da doença. Os principais antígenos presentes nas células β contra os quais são produzidos autoanticorpos são ácido glutâmico descarboxilase isoforma 65 (GAD65), tirosina fosfatase associada à insulinoma isoforma 2 (IA-2), transportador de zinco isoforma 8 (ZnT8) e insulina (PIHOKER *et al.*, 2005; ACHENBACH *et al.*, 2005; LONG *et al.*, 2012). O risco do desenvolvimento clínico da doença, com hiperglicemia evidente, cresce com o aumento do número de anticorpos, e fatores ambientais podem iniciar ou acelerar o progresso de destruição autoimune das células β (ALI, 2009).

O diabetes tipo 2 constitui uma condição heterogênea de hiperglicemia causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, os quais afetam a atividade secretória das células β e a sensibilidade tecidual à insulina. Esse tipo de diabetes abrange 90-95% dos casos, com aproximadamente 30% desses indivíduos ainda não diagnosticados, uma vez que a história natural do desenvolvimento clínico da doença envolve antecedentes pré-clínicos de hiperglicemia assintomática (GERICH, 1998; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Nesse estágio pré-clínico, os níveis glicêmicos pós-prandiais são moderadamente elevados, enquanto que as glicemias de jejum são mantidas dentro de uma faixa próxima da normalidade. A elevação dos níveis glicêmicos após a ingestão de uma carga de glucose acima de níveis normais caracteriza uma tolerância à glucose prejudicada, estágio esse que pode ser revertido. Devido a múltiplos defeitos na ação e na secreção de insulina, aproximadamente 30% desses indivíduos desenvolvem hiperglicemia sustentada, em que as glicemias de jejum e duas horas após o teste oral de tolerância à glucose dão o diagnóstico de diabetes (LAAKSO, 2008; MA; TONG, 2010).

A contribuição genética para suscetibilidade ao diabetes tipo 2 é bastante considerável: a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos é de 70-90%, comparada com a taxa bem menor de 15-25% entre gêmeos dizigóticos. Uma vez que a idade possui grande influência no risco de diabetes tipo 2, a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos pode alcançar até 100%, com o acompanhamento ao longo da vida. A maioria dos pacientes apresenta histórico familiar da doença, com risco aumentado acima de 40% na existência de algum parente de primeiro grau com diabetes tipo 2 (FONSECA; JOHN-KALARICKAL, 2009). É sugerido um padrão de herança poligênica com considerável

influência ambiental, podendo ser citados os genes PPAR-gama, IRS-1, INS e KCNJ11, dentre outros (FROGUEL; VELHO, 2001; STUMVOLL; GOLDSTEIN; van HAEFTEN, 2005). Fatores ambientais como obesidade (principalmente a obesidade abdominal), inatividade física e influências dietéticas aumentam muito o risco de diabetes tipo 2 em um indivíduo geneticamente predisposto (GRUNDY, 2000; NARAYAN *et al.*, 2007).

A disfunção secretória das células β e a resistência insulínica são fatores-chave na história natural do diabetes tipo 2 e tem sido debatido qual dessas condições seria o elemento primário da etiologia da doença ou se constituem defeitos primários independentes, questão bastante controversa, uma vez que resistência à insulina pode levar a defeitos na secreção de insulina e vice-versa (FONSECA; JOHN-KALARICKAL, 2009). Evidências obtidas de estudos longitudinais e transversais sugerem que a disfunção da célula β constitui o elemento primário na patogênese do diabetes tipo 2 (POLONSKY; STURIS; BELL, 1996; KAHN, 2001; PRATLEY; WEYER, 2001). Anormalidades na função da célula β já foram demonstradas em indivíduos geneticamente predispostos sem resistência insulínica e com tolerância à glucose normal e naqueles com resistência insulínica, porém, com tolerância à glucose normal devido a uma resposta adaptativa de hiperinsulinemia compensatória, os quais posteriormente desenvolveram diabetes (VAAG *et al.*, 1995; FERRANNINI *et al.*, 2005; ALSAHLI; GERICH, 2010).

Baseando-se nas evidências de que anormalidades na secreção insulínica constituem a base fisiopatológica do diabetes tipo 2, a história natural de desenvolvimento da doença se dá por conta de uma deterioração progressiva da função da célula β , acoplada à condição de resistência insulínica que a célula β não consegue compensar (KAHN, 2000). Em um primeiro momento, desenvolve-se uma tolerância à glucose prejudicada, que já evidencia um *deficit* de função da célula β que, no entanto, ainda consegue manter uma secreção basal de insulina capaz de manter níveis glicêmicos de jejum normais. A deterioração adicional da célula β , que também se dá por conta das hiperglicemias pós-prandiais (efeito glicotóxico) e de fatores decorrentes da condição de resistência insulínica e obesidade, como aumento sérico de ácidos graxos livres e liberação de fatores pró-inflamatórios e de certas adipocinas, resulta em níveis glicêmicos de jejum também elevados, progredindo para o alcance de glicemias de jejum e pós-prandiais que diagnosticam a instalação do diabetes (MEYER *et al.*, 2002; POITOUT; ROBERTSON, 2002; KERSHAW; FLIER, 2004; ALSAHLI; GERICH, 2010).

2.2.3. Alterações metabólicas no diabetes

As alterações metabólicas no diabetes são referentes às modificações no padrão de síntese e degradação de macromoléculas. Uma vez que a insulina está ausente (ou em concentrações muito baixas), o fluxo de carbono através de vias estimuladas por esse hormônio diminui, ocorrendo ativação de outras vias metabólicas em uma tentativa de contínuo fornecimento de combustível metabólico aos tecidos. Assim, essas alterações correspondem em mudanças no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (VELLA; RIZZA, 2010).

As alterações no metabolismo de carboidratos resultam, em última instância, em níveis elevados de glucose no sangue, característica marcante do diabetes não controlado. A hiperglicemia é causada por um aumento na produção de glucose hepática, através da ativação das vias gliconeogênicas e de quebra do glicogênio, juntamente com uma diminuição da sua utilização periférica, devida à incapacidade das células musculares e das adiposas de captarem glucose e a metabolizá-la com eficiência (HARVEY; FERRIER, 2011). Foi observado que a fosforilação da glucose após o transporte através da membrana é uma via defeituosa em pessoas com diabetes, bem como o é sua estocagem na forma de glicogênio. A hiperglicemia crônica, por si só, causa um aumento na resistência à insulina, de forma que pessoas com diabetes tipo 1 muito descompensado podem ter graus de resistência à insulina semelhantes aos observados em indivíduos com diabetes tipo 2 (VELLA; RIZZA, 2010).

Um aumento na taxa de lipólise é uma das principais alterações no metabolismo de lipídeos do diabetes não tratado, principalmente no tipo I, fazendo da β -oxidação de ácidos graxos uma via fornecedora de energia metabólica bastante ativa do decurso clínico da doença. A mobilização maciça de ácidos graxos do tecido adiposo é seguida por um aumento da síntese hepática de corpos cetônicos, resultando em níveis elevados de cetonemia. A cetoacidose diabética (presente em níveis glicêmicos superiores a 250 mg/dL) reduz o pH sanguíneo (acidose metabólica), podendo levar à depressão do nível de consciência, arritmia cardíaca e redução dos movimentos respiratórios (KITABCHI *et al.*, 2001; HARVEY; FERRIER, 2011).

Outra alteração metabólica referente ao metabolismo de lipídeos é a hipertriacilglicerolemia. Com um influxo de ácidos graxos para o fígado demasiadamente elevado, parte desses compostos não pode ser oxidada ou utilizada na síntese de corpos cetônicos, sendo o excesso convertido em triacilgliceróis, os quais são liberados para a circulação sistêmica na forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs). Com

níveis de insulina plasmática reduzidos, a ação degradativa de lipoproteínas pela lipase lipoproteica é reduzida, resultando em níveis plasmáticos de VLDL (como também de outras lipoproteínas como quilomícrons) elevados, culminando em hipertriacilglicerolemia (BASU; JENSEN, 2005).

O estado catabólico resultante da privação de insulina no diabetes tipo 1 também é verificado em relação ao metabolismo das proteínas. A proteólise aumentada, principalmente no músculo esquelético, acaba por promover perda líquida de proteína, de forma que os aminoácidos resultantes são bastante utilizados na gliconeogênese e muito pouco reutilizados para síntese de proteínas musculares (STUMP; NAIR, 2005; HEBERT; NAIR, 2010). O catabolismo proteico aumentado e a maior utilização de aminoácidos levam a um aumento da produção de uréia urinária durante a deficiência de insulina. A síntese hepática de algumas proteínas é diminuída, como ocorre com albumina e outras proteínas plasmáticas. Já para outras proteínas, como fibrinogênio e proteínas do leite esplênico, a síntese parece aumentar durante o estado de privação de insulina (NAIR *et al.*, 1995; CHARLTON; NAIR, 1998; HEBERT; NAIR, 2010; VELLA; RIZZA, 2010).

No diabetes tipo 2 parece haver um efeito de preservação ou de minimização do *turnover* proteico, embora já tenha sido relatado aumento no catabolismo proteico. A diferença na intensidade do *turnover* proteico entre indivíduos com diabetes tipo 1 e tipo 2 tem sido sugerida ao fato de que nesse último a secreção residual de insulina parece ser suficiente para limitar o catabolismo proteico (GOUGEON *et al.*, 2008; VELLA; RIZZA, 2010). Tem sido verificado que pessoas com diabetes tipo 2 apresentam elevadas concentrações de proteínas envolvidas na coagulação sanguínea, tais como ativador do plasminogênio e inibidor tipo 1 do ativador do plasminogênio (HUGHES *et al.*, 1998; KRUSZYNSKA *et al.*, 2000).

Uma ocorrência metabólica resultante da hiperglicemia persistente é o aumento da glicação não enzimática de proteínas. Esse processo, de ocorrência natural, é caracterizado pela ligação da glucose ao grupo amino de proteínas. É o caso da formação de hemoglobina glicada (HbA_{1c}), resultante da interação irreversível entre a glucose e a valina terminal da cadeia β da hemoglobina. A intensidade de glicação depende dos valores glicêmicos e do tempo de exposição das hemácias à hiperglicemia. A porcentagem de HbA_{1c} dá uma idéia de como estiveram os níveis glicêmicos em um período de 60-90 dias. Assim, resultados dentro de um intervalo normal indicam que o paciente tem estado sob um bom controle metabólico, enquanto que valores elevados indicam controles glicêmicos ruins (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

2.2.4. Complicações crônicas do diabetes mellitus

A exposição prolongada à hiperglicemia está relacionada ao desenvolvimento de complicações em longo prazo de diversos tecidos, podendo ser agrupadas em complicações microvasculares, que acometem retina, glomérulos renais e neurônios periféricos, e em complicações macrovasculares, que abrangem a doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica e insuficiência cardíaca (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP, 1998; TRICHES *et al.*, 2009).

As complicações microvasculares têm sua origem no aumento das concentrações intracelulares de glucose, sendo a retina, os glomérulos renais e os nervos periféricos tecidos-alvo da hiperglicemia crônica, uma vez que eles falham no processo de redução da captação de glucose (*downregulation*) quando os níveis glicêmicos extracelulares são elevados, o que favorece os aumentos glicêmicos dentro da célula (GIACCO; BROWNLEE, 2010). A hiperglicemia intracelular promove danos teciduais por, pelo menos, cinco mecanismos, que parecem ser ativados pelo aumento da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio: (1) aumento do fluxo de glucose através da via dos polióis; (2) aumento intracelular de produtos finais de glicação avançada (AGEs); (3) aumento da expressão do receptor para AGEs (RAGEs); (4) ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e (5) aumento da atividade da via das hexosaminas (RASK-MADSEN; HE; KING, 2005; FOWLER, 2008; GIACCO; BROWNLEE, 2010).

As complicações macrovasculares são as principais causas de morte em pacientes diabéticos e a presença de diabetes constitui um fator de risco independente para o aparecimento de tais alterações. O risco relativo para doença cardiovascular aumenta de duas a quatro vezes em pacientes com diabetes tipo 2, quando comparados com a população geral (SCHAAN; HARZHEIM; GUS, 2004; SCHEFFEL *et al.*, 2004). Pacientes diabéticos possuem pior prognóstico em relação à doença arterial coronariana, com maiores riscos de recorrências e piores respostas ao tratamento, maior frequência de insuficiência cardíaca, risco duplicado de recorrência de acidente vascular cerebral e aumento da incidência de amputações de membros inferiores por conta de doença vascular periférica (MALMBERG *et al.*, 1996; TUOMILEHTO *et al.*, 1996; QUADROS *et al.*, 2007; CANAVAN *et al.*, 2008).

A retinopatia diabética é a principal causa de cegueira em pacientes diabéticos entre 25 e 74 anos. Nos Estados Unidos, o diabetes constitui a quarta causa de cegueira adquirida (AIELLO; AIELLO; CAVALLERANO, 2005; BOSCO *et al.*, 2005). A prevalência de

retinopatia em adultos nos Estados Unidos alcança taxas elevadas: entre aqueles com 18 anos de idade ou mais, com diabetes tipo 1 diagnosticado antes dos 30 anos de idade, as taxas são de aproximadamente 75% e 82% em pessoas de pele escura e clara, respectivamente, e entre diabéticos com idade igual ou superior a 40 anos, a taxa é de aproximadamente 40% (ROY *et al.*, 2004; THE EYE DISEASES PREVALENCE RESEARCH GROUP, 2004). Uma das principais causas das alterações oculares é o aumento de sorbitol e de frutose em decorrência da hiperglicemia intracelular. O conseqüente aumento da osmolaridade intracelular acaba por aumentar o influxo de água, resultando em lesão celular osmótica. Perda do tônus vascular, alteração do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade, obstrução vascular e hemorragias são alterações circulatórias do tecido retiniano decorrentes de hiperglicemia crônica (BOSCO *et al.*, 2005; SCANLON, 2010).

A nefropatia diabética é a principal causa de doença renal crônica em pacientes que iniciam a terapia dialítica de substituição renal, sendo associada com aumento da mortalidade cardiovascular (BRUNO; GROSS, 2000; VALMADRID *et al.*, 2000). Ocorrem espessamento da membrana basal capilar glomerular, proliferação de células mesangiais, comprometimento das artérias e arteríolas renais e lesão dos túbulos renais. O principal parâmetro funcional da nefropatia diabética é a taxa de excreção de albumina, que evolui de um pequeno aumento inicial da albumina urinária (microalbuminúria) até uma proteinúria típica que caracteriza a doença efetivamente instalada. Na maioria dos casos, proteinúria é acompanhada de reduções progressivas das taxas de filtração glomerular, até resultar em insuficiência renal terminal. Conseqüentemente, níveis plasmáticos de metabólitos como uréia e creatinina se elevam (JERUMS; PANAGIOTOPOULOS; MacISAAC, 2003; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009; WILLIAMS; STANTON, 2010).

A neuropatia diabética consiste em lesões e alterações na fisiologia do sistema nervoso periférico, afetando funções motoras e, principalmente, sensoriais. As lesões ocorrem nos elementos neural, glial, vascular e no tecido conjuntivo dos nervos periféricos, promovendo atrofia e perda de fibras mielinizadas e não mielinizadas (DIAS; CARNEIRO, 2000). A dor associada à neuropatia diabética exerce um considerável impacto na qualidade de vida, uma vez que causa prejuízos no sono e nas atividades diárias (ZIEGLER, 2010).

2.2.5. Aspectos terapêuticos do diabetes

O tratamento do diabetes requer uma interação entre três elementos básicos: medicamento, dieta e exercício físico. A manutenção de um bom controle depende da

aderência do paciente ao tratamento medicamentoso proposto, bem como do tipo e quantidade de nutrientes ingeridos e do seguimento de um programa de atividade física (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004).

No paciente com diabetes tipo 1, doses diárias de insulina exógena são necessárias para repor a insulina não produzida, a fim de manter as funções metabólicas insulino-dependentes normais, bem como de promover a normalização dos níveis glicêmicos. Atualmente, são produzidos análogos de insulina, através da tecnologia do DNA recombinante, que diferem no tempo de ação, presença de picos de ação e eficiência metabólica para reduzir os níveis de glicemia. No tipo 2, o tratamento farmacológico se faz com antidiabéticos orais, que podem agir de várias formas, dependendo da classe de droga utilizada. Sulfoniluréias, como glibenclamida, atuam como secretagogos de insulina (TABELA 3). Apesar disso, em alguma momento, doses de insulina exógena podem ser necessárias para um melhor controle metabólico no diabetes tipo 2 (WATKINS *et al.*, 2003; GENUTH, 2008).

Fatores nutricionais também afetam os níveis glicêmicos e podem atuar como coadjuvante no tratamento do diabetes, sendo o controle da ingestão de carboidratos e do tipo de carboidrato evidentemente um ponto-chave para conseguir tal objetivo. Dietas adequadas em termos de qualidade lipídica são de grande importância, tendo em vista o risco cardiovascular que a doença por si já aumenta. Outros componentes, como fibras e antioxidantes presentes em fontes vegetais podem ter alguma contribuição na redução dos níveis de glucose no sangue e, nesse sentido, pesquisas com plantas tem sido realizadas com intuito de se encontrar fontes terapêuticas no âmbito nutricional e, também, farmacológico (BEEBE, 2003).

2.3. Modelos animais de diabetes *mellitus*

A utilização de modelos animais tem dado importante contribuição para o entendimento da etiologia e fisiopatologia do diabetes tipo 1 e tipo 2, para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos hipoglicemiantes e descoberta de novas fontes vegetais com potencial de redução glicêmica (NEGRI, 2005; CHRISTOPHER; TAKEUCHI; LEE, 2009). Animais experimentais participaram de muitos aspectos históricos do diabetes: a descoberta da importância do pâncreas na homeostase da glucose se deu através de experimentos realizados em 1889 com cães pancreatectomizados, dos quais os pesquisadores Oskar Minkowski e Josef von Mering relataram intensa poliúria e presença de glucose urinária.

TABELA 3 – Preparações de insulina e antidiabéticos orais disponíveis no mercado

Preparações de insulina				
Tipo de insulina	Categoria	Início (minutos)	Duração (horas)	Pico de ação (horas)
Regular	Rápida	30 a 60	6 a 8	2 a 4
Inalada	Rápida	15 a 30	6 a 8	2 a 4
Lispro	Ultrarápida	5 a 15	4 a 6	1 a 2
Aspart	Ultrarápida	5 a 15	4 a 6	1 a 2
Glulisina	Ultrarápida	5 a 15	4 a 6	1 a 2
NPH	Intermediária	1 a 2	10 a 14	4 a 8
Detemir	Lenta	2 a 3	9 a 24	Sem pico
Glargina	Lenta	1,5 a 3	20 a 24	Sem pico
Antidiabéticos orais				
Classe	Exemplo	Mecanismo hipoglicemiante		
Biguanidas	Metformina	Diminui a resistência insulínica		
Sulfoniluréias	Glibenclamida	Estimula a secreção de insulina (ação lenta)		
Meglitinidas	Repaglinida	Estimula a secreção de insulina (ação rápida)		
Gliptinas	Sitagliptina	Aumenta o tempo de meia-vida de hormônios insulínicos		
Tiazolidinedionas	Rosiglitazona	Aumenta a sensibilidade á insulina		
Inibidores da α-glicosidase	Acarbose	Reduz a taxa de digestão de carboidratos		

Fonte: GENUTH, 2008; BAILEY; KRENTZ, 2010.

Posteriormente, especulações adicionais acerca da participação pancreática na redução da glicemia culminaram com a descoberta e purificação da insulina em 1921, pelos pesquisadores Frederick Banting, James Collip, Macleod e Charles Best, a partir de extratos etanólicos de pâncreas. Tais eventos contribuíram para a determinação da estrutura primária da insulina, em 1955, por Frederick Sanger e para a elucidação da estrutura tridimensional desse hormônio, por Dorothy Hodgkin, em 1969 (TATTERSALL, 2010).

Roedores, principalmente ratos e camundongos, são os animais predominantemente usados como modelos de diabetes, tanto por razões de fácil manuseio como, também, pelos custos relativamente baixos de manutenção desses animais. Outros animais, tais como coelhos, gatos, cães, porcos e primatas não humanos também têm sido utilizados como modelos de diabetes, porém tal utilização requer recursos instrumentais mais especializados e maior perícia na manipulação, elevando os custos de manutenção, além do que a utilização experimental de animais maiores é mais rigidamente regulada do que a de ratos e camundongos (SATO *et al.*, 2006; CHRISTOPHER; TAKEUCHI; LEE, 2009).

Os diversos modelos animais utilizados na pesquisa em diabetes podem ser agrupados em categorias, que diferem etiologicamente quanto à instalação do estado diabético. Assim, podem ser citados modelos cirúrgicos, modelos espontâneos, modelos geneticamente modificados, modelos dieteticamente induzidos e modelos quimicamente induzidos. Características similares exibidas por qualquer modelo utilizado incluem hiperglicemia crônica e sintomas associados, tais como poliúria, polidipsia, polifagia e aparecimento de complicações crônicas. Algumas diferenças incluem o grau de severidade do estado hiperglicêmico, podendo causar letargia em alguns modelos, bem como um ou outro aspecto metabólico que caracteriza especificamente determinados modelos. Assim, a escolha de um determinado modelo depende dos objetivos e hipóteses que se pretende estudar, de forma que um modelo escolhido adequadamente minimiza os riscos de interpretações equivocadas (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007; ETUK, 2010).

A pancreatectomia consiste em um método cirúrgico clássico de indução de diabetes *mellitus*. O diabetes é instalado tanto pela completa remoção (pancreatectomia total) como, também, pela remoção de parte do pâncreas (pancreatectomia parcial). A pancreatectomia é mais facilmente realizável em cães, porém pode ser também realizada em roedores. Animais com pâncreas totalmente removido desenvolvem, quanto à severidade da hiperglicemia e aos níveis insulinêmicos, um diabetes clinicamente do tipo 1, tendo tais modelos contribuído em estudos de desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo e em estudos que testaram várias preparações de insulina e outros recursos tecnológicos desenvolvidos para o tratamento do

diabetes. A pancreatectomia parcial, com retirada de 70 a 90% do pâncreas, reproduz um diabetes clinicamente do tipo 2, desenvolvendo hiperglicemia moderada e defeitos na secreção de insulina estimulada por glucose (SIEHER; TRAYSTMAN, 1993; SRINIVASAN; RAMARAO, 2007).

O uso de técnicas de biologia molecular tem possibilitado a produção de modelos animais geneticamente modificados, permitindo elucidar mecanismos moleculares relacionados ao diabetes. Dependendo de como foram produzidos, esses animais podem ser agrupados em modelos transgênicos e em modelos *knockout*. Os modelos transgênicos são aqueles que expressam um gene modificado (transgene) que foi incorporado em seus pró-núcleos quando ainda eram zigotos. A expressão desses genes pode induzir o estímulo diabetogênico por alterar algum aspecto relacionado ao metabolismo normal da glucose e/ou a fisiologia da célula β pancreática. Animais diabéticos *knockout* para determinado gene são produzidos pela inativação de um determinado gene, através da inserção de um fragmento homólogo de DNA que substitui ou interrompe o gene normal, resultando em fenótipos que caracterizam o estado hiperglicêmico. Exemplos desses animais *knockout* incluem aqueles cujos genes para receptor de insulina e para o transportador GLUT4 estão inativados, resultando em hiperglicemia severa no primeiro caso e em resistência insulínica no segundo (REES; ALCOLADO, 2005; CHRISTOPHER; TAKEUCHI; LEE, 2009).

Os modelos espontâneos de diabetes abrangem animais que desenvolvem espontaneamente a doença através de mutações ao caso, de forma que novas colônias de mutantes espontâneos são produzidas através da seleção de afetados para reprodução. Dois ótimos modelos espontâneos de diabetes tipo 1 são os camundongos NOD (*non-obese diabetic*) e os ratos BB (*BioBreeding*), nos quais ocorre ataque autoimune contra as ilhotas pancreáticas, havendo recrutamento de linfócitos T e B, macrófagos e células matadoras naturais e presença de autoanticorpos, assim como ocorre em humanos (MATHEWS; LEITER, 2005). Os modelos animais de diabetes tipo 2 incluem os modelos monogênicos, com mutações referentes a um único *locus* (camundongos *ob/ob* e *db/db*, os quais apresentam mutações relacionadas aos genes da leptina e do receptor de leptina) e os modelos poligenéticos, abrangendo mutações envolvendo vários *locus*, tendo como exemplos o camundongo KK (*Kuo Kondo*) e o camundongo NZO (*New Zealand Obese*), ambos obesos e resistentes à insulina (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007).

A indução química de diabetes experimental por meio da administração de agentes tóxicos às células β constitui um método bastante utilizado em pesquisas relacionadas ao

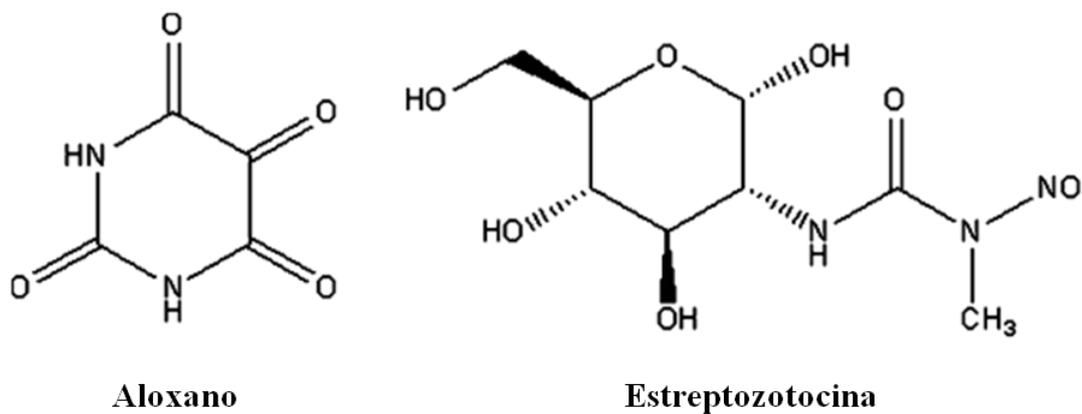
diabetes. Algumas substâncias diabetogênicas que podem ser citadas incluem: aloxano, estreptozotocina, ditizona, 8-hidroxiquinolona e vacor, sendo aloxano e estreptozotocina os principais indutores de diabetes utilizados (REES; ALCOLADO, 2005; LENZEN, 2008) (FIGURA 2). As vias geralmente utilizadas para administração desses principais diabetogênicos são a intravenosa e a intraperitoneal, com doses muito variadas (40-200 mg/Kg), sendo, de uma forma geral, considerados diabéticos os animais que apresentarem glicemias ≥ 200 mg/dL. (SRINIVASAN; RAMARAO, 2007).

A estreptozotocina é uma nitrosuréia isolada do fungo *Streptomyces achromogenes*, sendo um produto de sua atividade fermentativa e que apresenta um amplo espectro de atividade antibiótica e antineoplásica. Possui intensa ação alquilante e liga-se de forma seletiva às células β pancreáticas, aí exercendo efeito citotóxico e cessando a síntese e secreção de insulina por essas células. Praticamente não é alterada metabolicamente, uma vez que se acumula fortemente nas células β do pâncreas após administração. Esse agente também induz diabetes em porcos da Índia, camundongos, macacos e cães. Coelhos, no entanto, mostraram-se resistentes a esse efeito diabetogênico (SZKUDELSKI, 2001; REES; ALCOLADO, 2005; SATO *et al.*, 2006).

Aloxano é uma pirimidina, de estrutura semelhante à do ácido úrico e à da glucose e, assim como a estreptozotocina, liga-se de forma específica e fortemente às células β pancreáticas, destruindo-as. Além do rato, pesquisas têm mostrado outras espécies que são passíveis de desenvolverem diabetes aloxânico, tais como coelhos, cães, gatos, ovelhas, macacos, porcos e camundongos. Porcos da Índia, contudo, mostraram-se resistentes (SZKUDELSKI, 2001; SATO *et al.*, 2006). A ação citotóxica do aloxano sobre as células β se deve à sua habilidade em gerar espécies reativas de oxigênio por meio de reações cíclicas redox, resultando em necrose dessas células, particularmente sensíveis a pequenos aumentos de espécies reativas de oxigênio (ELSNER; GURGUL-CONVEY; LENZEN, 2006; LENZEN, 2008).

Evidências de danos às células β do pâncreas induzidos por aloxano surgem entre 2 e 5 minutos e lesões irreversíveis são observadas em 24 horas, correspondendo efetivamente à instalação da doença. Evidências de danos por estreptozotocina aparecem entre 30 minutos e 2 horas. Para ambos, as doses efetivamente diabetogênicas são quatro a cinco vezes menores do que as doses letais e as alterações metabólicas decorrentes da ação do aloxano parecem ser mais intensas quando comparadas com aquelas geradas pela estreptozotocina, sendo essa última, de uma forma geral, mais eficaz e mais específica para células β do que o aloxano.

FIGURA 2 – Estrutura química das moléculas de aloxano e estreptozotocina.



Fonte: LENZEN, 2008

Esses dois diabetogênicos mimetizam a lesão das células β do pâncreas que ocorre na etiologia do diabetes tipo 1, causando uma doença relativamente permanente, embora haja relatos que, dependendo da dose utilizada, pode ser produzida, quanto à intensidade da lesão, diabetes tipo 1 ou tipo 2 (REES; ALCOLADO, 2005; SATO *et al.*, 2006; CHRISTOPHER; TAKEUCHI; LEE, 2009).

2.4. Efeito hipoglicemiante de compostos de plantas

A utilização de plantas pelo homem com o objetivo de tratar doenças tem sua origem nas antigas civilizações e consistiu no primeiro recurso terapêutico utilizado pelos povos. Historicamente, a descoberta de propriedades úteis das plantas tem sido baseada no conhecimento empírico de observações do comportamento de animais e de humanos após a sua ingestão. De fato, a utilização de plantas como recurso terapêutico faz parte da evolução humana, uma vez que tais recursos eram utilizados como fonte necessária à sobrevivência (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Diversas são as espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional indiana, chinesa, africana e ocidental para o tratamento do diabetes (OLIVEIRA; SAITO, 1989; RYAN; PICK; MARCEAU, 2001; BNOUHAM *et al.*, 2002; CARNEY *et al.*, 2002; GROVER; YADAV; VATS, 2002; LI *et al.*, 2004; ALLALI *et al.*, 2008). Abordagens etnofarmacológicas têm demonstrado atividade hipoglicemiante de extratos de tais plantas medicinais em modelos animais diabéticos e, também, em humanos. Dentre as principais famílias de plantas com tal potencial podem ser citadas: Fabaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Liliaceae, Poaceae, Euphorbiaceae, Cucurbitaceae, Asphodelaceae, Myrtaceae e Asclepiadaceae. Folhas, frutos, sementes, raízes e cascas são alguns dos tecidos vegetais que contêm substâncias com propriedades hipoglicemiantes. (YEH *et al.*, 2003; NEGRI, 2005; MENTREDDY, 2007).

Alguns dos mecanismos pelos quais se dá a atividade hipoglicemiante dos extratos de tecidos vegetais compreendem: (a) estimulação da secreção de insulina pelas células β (efeito secretagogo); (b) aumento da sensibilidade periférica à insulina através do aumento do número de sítios receptores sensíveis à insulina; (c) diminuição de hormônios hiperglicemiantes; (d) incremento do consumo de glucose pelos tecidos e (e) efeitos insulino-miméticos diretos (LI *et al.*, 2004; NEGRI, 2005).

O potencial antidiabético de alguns extratos não se resume somente à diminuição da glicemia, mas se estende à normalização de parâmetros relacionados com a etiologia e

patogenia do diabetes, varrendo radicais livres do organismo e melhorando alterações do metabolismo lipídico e proteico. Extratos de *Momordica charantia* e de *Eugenia jambolana*, por exemplo, se mostraram capazes de prevenir alterações renais na morfologia e em parâmetros bioquímicos como albuminúria, além de evitarem a formação de catarata (GROVER *et al.*, 2001; RATHI *et al.*, 2002; LINO *et al.*, 2004; NEGRI, 2005).

Ainda com respeito às alterações relacionadas aos efeitos hiperglicêmicos do diabetes, redução de lesões cerebrais foi observada com *Syzygium cumini* e menores elevações de creatinina plasmática foram detectadas com extrato de *Brassica juncea*, postergando o desenvolvimento de nefropatia diabética. Melhoras na cicatrização de ferimentos em ratos diabéticos, efeitos vasoprotetores e impedimento de complicações cardiovasculares diabéticas também foram verificados para certos extratos vegetais (OKYAR *et al.*, 2001; BALUCHNEJADMOJARAD *et al.*, 2003; GROVER; YADAV; VATS, 2003; PRINCE; KAMALAKKANNAN; MENON, 2003; GOKCE; HAZNEDAROGLU, 2008).

Os efeitos hipoglicemiantes de extratos de tecidos de plantas são creditados, principalmente, a substâncias derivadas do metabolismo secundário vegetal (metabólitos secundários), que constituem moléculas com grande diversidade e complexidade estrutural. Contrariamente ao que ocorre com macromoléculas do metabolismo primário (carboidratos, proteínas, lipídios), os metabólitos secundários são produzidos em pequena escala e apresentam distribuição mais restrita no reino vegetal. Enquanto as moléculas do metabolismo primário desempenham funções essenciais no corpo do vegetal, tais como fornecimento de energia e matéria-prima para biossíntese e crescimento, os metabólitos secundários estão relacionados a funções adaptativas, como as relacionadas aos mecanismos de defesa química (GERSHENZON, 2004; NEGRI *et al.*, 2005; DORNAS *et al.*, 2009). Os principais compostos secundários que têm mostrado efeitos na redução da glicemia são: terpenóides, alcalóides, cumarinas, flavonóides e outras substâncias fenólicas (BIERER *et al.*, 1998; FORT *et al.*, 2000; KUBO *et al.*, 2000; YOSHIKAWA *et al.*, 2001; DAS *et al.*, 2001; MARUKAMI; KISHI; YOSHIKAWA, 2001; OJEWOLE, 2002; SABU; KUTTAN, 2002; SOMOVA *et al.*, 2003; AL-AWWADI *et al.*, 2004; KANG *et al.*, 2005; KASIVISWANATH; RAMESH; KUMAR, 2005; MAI; CHUYEN, 2007). Apesar de serem os compostos aos quais mais se atribuem os efeitos hipoglicemiantes, não são os únicos capazes de exercerem tal atividade. Outras classes de compostos que também têm demonstrado atividade hipoglicemiante incluem vitaminas, polissacarídeos, peptideoglicanos, esteróides, glicopeptídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (MENTREDDY, 2007; DORNAS *et al.*, 2009).

A amenização do estado hiperglicêmico, bem como a atenuação da progressão de complicações diabéticas e proteção contra agentes diabetogênicos, quando do tratamento com extratos vegetais, podem estar relacionadas à capacidade antioxidante desses extratos. Reduções nos níveis de malondialdeído e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) revelam uma proteção contra a peroxidação lipídica deletéria. Além disso, aumentos na expressão e na atividade de enzimas varredoras de radicais livres, tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, também já foram observados a nível plasmático, hepático e renal (RAJASEKARAN; SIVAGNANAM; SUBRAMANIAN, 2005; AL-AZZAWIE; ALHAMDANI, 2006; ULICNA *et al.*, 2006).

De uma forma geral, nos estudos com animais diabéticos, os extratos são administrados na forma de pó, obtido por meio de liofilização, que é ressolubilizado em um determinado diluente, cujas doses administradas raramente ultrapassam 600 mg/Kg de peso corpóreo. Por via oral, as doses geralmente têm variado entre 50-300 mg/Kg (ANANTHAN *et al.*, 2004; PARI; SATHEESH, 2004; GOKCE; HAZNEDAROGLU, 2008; JAISWAL *et al.*, 2009), chegando a doses de 400 mg/Kg (GROVER; VATS; RATHI, 2000) e de 450 mg/Kg (PARI; LATHA, 2002). Por via intraperitoneal, doses de 100 mg/Kg (XIE *et al.*, 2003) e de até 600 mg/Kg (TANKO *et al.*, 2008; EIDI *et al.*, 2010) já foram testadas. O efeito agudo nas glicemias de animais diabéticos foi avaliado através da mensuração glicêmica horas após a administração dos extratos e através da realização de testes de tolerância à glucose. O tempo de duração dos experimentos de doses repetidas variou de uns poucos dias a meses, sendo grande parte dos experimentos realizados na faixa de 2 a 4 semanas (DORNAS *et al.*, 2009).

2.5. Proteínas vegetais como agentes hipoglicemiantes

Poucos trabalhos têm verificado o efeito de proteínas vegetais como agentes hipoglicemiantes. Lectinas de plantas são exemplos de proteínas vegetais que já tiveram efeitos antidiabéticos documentados. Em ratos diabetizados por estreptozotocina, uma dose de 100 mg/Kg de lectina isolada de semente de *Urtica pilulifera*, administrada por via intraperitoneal, reduziu a glicemia ao longo de 4 semanas de tratamento, com injeções diárias da proteína. Por outro lado, nos ratos diabéticos não tratados, foi verificada uma elevação da glicemia ao longo das 4 semanas de estudo (KAVALALI *et al.*, 2003).

As lectinas concanavalina A (Con A) e fitohemaglutinina (PHA), de *Canavalia ensiformis* e de *Phaseolus vulgaris*, respectivamente, mimetizaram os efeitos *in vitro* da

insulina na inibição da fosforilação em envelopes nucleares isolados de ratos. Comparado ao controle positivo (envelopes tratados somente com fósforo marcado ^{32}P), no qual ocorreu 100% de incorporação de ^{32}P , insulina (10^{-11} M), Con A ($10 \mu\text{g/mL}$), PHA ($10 \mu\text{g/mL}$) e anticorpo contra receptores de insulina (diluído em soro 1:10000) permitiram taxas de incorporação bem próximas, correspondendo a 64%, 68%, 70% e 66%, respectivamente. Uma vez que as taxas de fosforilação na presença simultânea de insulina e de Con A foram similares às aquelas verificadas por esses compostos separadamente, foi proposto que Con A atua via receptores de insulina, mimetizando o efeito desse hormônio (PURRELLO; BURNHAM; GOLDFINE, 1983).

Outro trabalho que mostrou o potencial antidiabético de proteínas foi o realizado por Czech e Lynn (1973), no qual Con A e a aglutinina de *Lens culanaris* aumentaram a oxidação de glucose a CO_2 em células adiposas isoladas de ratas, mimetizando o efeito da insulina no aumento de tal estímulo metabólico. Além disso, Con A apresentou a habilidade de inibir a lipólise, de forma similar como o faz o estímulo insulínico.

Na década de 70, foi desenvolvido e patenteado um método de obtenção de um composto proteico a partir de frutos e sementes de *Mormodica charantia*, com ponto de fusão, espectro infravermelho e perfil eletroforético em sílica-gel similares aos da insulina humana. Ensaio cromatográfico em camada delgada mostraram que os hidrolisados do composto isolado e os da insulina produziram cromatogramas similares, mostrando padrões aminoacídicos bastante coincidentes, inclusive no que diz respeito à ausência de certos aminoácidos (KHANNA *et al.*, 1976). O polipeptídeo-p, nome dado a esse composto proteico, além de mostrar características bioquímicas semelhantes às da insulina também apresentou atividade hipoglicemiante em animais e em humanos. Reduções glicêmicas significativas foram verificadas em gerbos e em macacos langures, após administração subcutânea do polipeptídeo-p. Tal efeito hipoglicemiante também foi verificado em pacientes com diabetes tipo 1 ou tipo 2. O perfil eletroforético do polipeptídeo-p foi também muito similar ao da insulina bovina, apresentando uma massa molecular aproximada de 11.000 Daltons, após análise de seus aminoácidos constituintes em um analisador automático (KHANNA; JAIN, 1981).

O extrato proteico de frutos de *M. charantia*, obtido por um processo de extração semelhante ao que foi utilizado para isolar o polipeptídeo-p, porém com algumas modificações, apresentou atividade hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos, estimulando também a secreção de insulina por pâncreas perfusionados de ratos. Além disso, o extrato aumentou a captação de glucose por culturas de células musculares C2C12 e

adiposas 3T3-L1, mostrando que o efeito hipoglicêmico do extrato pode estar relacionado a vias de estímulo de secreção de insulina, como também a vias insulinomiméticas (YIBCHOK-ANUN *et al.*, 2006).

Existem outros relatos na literatura de compostos proteicos do tipo insulina em vegetais. A partir de folhas de determinadas espécies, tais compostos foram não só detectados, mas, também, parcialmente purificados (COLLIER *et al.*, 1987; SILVA *et al.*, 2002). Uma proteína de 6 kDa isolada de folhas de *Bauhinia variegata*, com propriedades bioquímicas semelhantes à insulina, exerceu efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos (AZEVEDO *et al.*, 2006). De sementes de *C. ensiformis* e de *Vigna unguiculata*, já foram isoladas e detectadas proteínas com sequência homóloga e perfil de eluição cromatográfica semelhante à da insulina bovina e que, também, reagiram com anticorpos anti-insulina (OLIVEIRA *et al.*, 1999; VENÂNCIO *et al.*, 2003).

A presença de insulina ou de proteínas do tipo insulina em vertebrados e em outros organismos como micróbios, insetos, cianobactérias, fungos, algas e plantas revela que tais moléculas foram evolutivamente conservadas, provavelmente regulando vias de sinalização similares (LEROITH *et al.*, 1985; OLIVEIRA *et al.*, 1999; CHAN; STEINER, 2000; SOWER; SUZUKI; REED, 2000; SILVA *et al.*, 2002). Em vegetais, tem sido observado que a insulina bovina promove a germinação de sementes, acelera a síntese de proteínas ribossomais em embriões e aumenta a atividade de enzimas de glioxissomos (GOODMAN; DAVIS, 1993; JIMÉNEZ; BELTRÁN-PENÃ; ORTÍZ-LÓPEZ, 1999; DINKOVA; AGUILAR; JIMÉNEZ, 2000). Foi suposto que tais proteínas do tipo insulina tenham nos vegetais algum papel relacionado ao transporte de glucose ao embrião, função similar à da insulina em vertebrados (VENÂNCIO *et al.*, 2003).

2.6. *Moringa oleifera*

A moringa (*Moringa oleifera* Lam.) é uma espécie perene do nordeste da Índia, de pequeno a médio porte e de crescimento rápido, distribuindo-se hoje nas Filipinas, América Central, América do Norte e América do Sul. É adaptada a diversos tipos de condições climáticas, desde as subtropicais secas e úmidas até tropicais secas e florestas úmidas. Pertence à família Moringaceae, que contém 1 gênero e 14 espécies. A planta é capaz de suportar longos períodos de estiagem, consegue sobreviver em solos pobres e adapta-se a uma ampla faixa de solos, com melhor desenvolvimento nos neutros ou levemente ácidos (ANWAR *et al.*, 2007; GOYAL *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

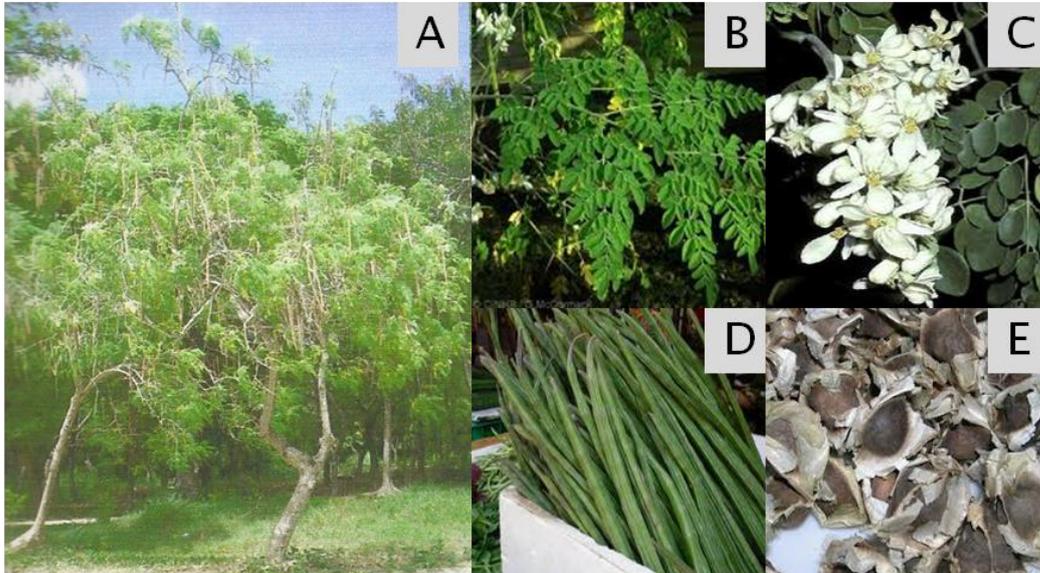
As flores, frutos, folhas e sementes da moringa são utilizados como alimentos em muitos países como Índia, Paquistão, Havaí e vários países da África (FIGURA 3). Análises químicas desses órgãos têm mostrado amplo valor nutricional: folhas de moringa são boas fontes de antioxidantes, tais como vitamina C, β -carotenóides, flavonóides e outros compostos fenólicos, além de cálcio e potássio; as sementes são ricas em proteínas e lipídios, apresentando uma proteína coagulante de fundamental importância biotecnológica como agente clarificante no tratamento de água potável; flores e frutos são também ricos em vitamina C e em outros antioxidantes naturais, porém pobres em β -carotenóides (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995; ANWAR *et al.*, 2007; MOURA *et al.*, 2009).

Folhas e sementes são os órgãos da moringa com maior conteúdo de proteínas. Folhas *in natura* apresentam teor proteico em torno de 6,4-6,7%. A proteína é o composto encontrado em maior quantidade nas sementes, com um teor médio de 40%, apresentando grandes quantidades de corpos proteicos (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006; MOURA *et al.*, 2009).

Muitas propriedades farmacológicas têm sido descritas para substâncias de diversos tecidos da moringa, tais como ação anti-inflamatória, hepatoprotetora, antimicrobiana, protetora contra estresse oxidativo, hipolipidêmica e antidiabética (GUEVARA *et al.*, 1999; KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003; MEHTA *et al.*, 2003; NIKKON *et al.*, 2003; FAKURAZI; HAIRUSZAH; NANTHINI, 2008; MEHTA; AGRAWAL, 2008; PEREIRA *et al.*, 2011; SINHA *et al.*, 2011). Tais propriedades embasam a utilização da moringa na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, muitas delas associadas ao diabetes, em virtude da presença dessas e de algumas outras propriedades farmacológicas (GOYAL *et al.*, 2007).

Dando ênfase ao efeito antidiabético, extratos aquosos de folhas de moringa foram efetivos em reduzir os níveis glicêmicos de ratos diabéticos durante teste oral de tolerância à glucose. As doses administradas promoveram reduções significativas após 3 horas da administração intragástrica de solução de glucose, tanto em animais subdiabéticos como nos moderadamente diabéticos. O extrato das folhas também promoveu reduções significativas na glicemia de jejum e na glicemia pós-prandial de ratos severamente diabéticos, porém com tratamento crônico (JAISWAL *et al.*, 2009).

FIGURA 3 – *Moringa oleifera* Lam. (A) Árvore de *Moringa oleifera*; (B) Folhas; (C) Flores; (D) Frutos; (E) Sementes.



Em outro modelo de roedor com diabetes quimicamente induzido, o extrato etanólico da casca do tronco reduziu os níveis hiperglicêmicos para níveis normais e eliminou a glicosúria, presente no período anterior ao tratamento. Em modelos espontâneos de diabetes tipo 2, folhas de moringa também reduziram os níveis glicêmicos de forma significativa. A dose de 200 mg/dL do pó da folha, que foi suspenso na mesma solução de glucose administrada em teste oral de tolerância à glucose, reduziu significativamente as glicemias 20, 30, 45 e 60 minutos após o início do teste. Nesses animais, o tratamento com o pó da folha também diminuiu o esvaziamento gástrico, constituindo um mecanismo antidiabético por meio do retardo da absorção de glucose pelo intestino, aliviando, assim, o efeito hiperglicêmico pós-absortivo (KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 2003; NDONG *et al.*, 2007).

Compostos bioativos isolados de extratos metanólicos dos frutos de moringa mostraram-se potentes secretagogos de insulina, em um ensaio *in vitro*. A incubação de linhagens celulares de células β pancreáticas com 100 ppm de *N*-benzil tiocarbamatos, *N*-benzil carbamatos, benzil nitrilas e benzil éster, isolados desses extratos, resultou na liberação de 15-33 ng insulina/mg proteína, enquanto que a incubação dessas células com 4 mM de glucose (o principal indutor de secreção de insulina em sistemas vivos) promoveu a liberação de 4-6 ng insulina/mg proteína (FRANCIS *et al.*, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito do *pool* de proteínas extraídas de folhas de *Moringa oleifera* na glicemia de modelos animais diabéticos.

3.2. Específicos

- Realizar a extração proteica de folhas de moringa e concentrar o material obtido através de um método de precipitação de proteínas;
- Caracterizar a fração proteica por meio da análise do perfil eletroforético, da digestibilidade *in vitro*, da presença de atividades enzimáticas antioxidantes e de reação cruzada com o anticorpo anti-insulina;
- Verificar o efeito agudo da fração proteica na glicemia de animais diabéticos através da realização de curvas glicêmicas;
- Verificar o efeito crônico da fração proteica obtida na glicemia, em parâmetros bioquímicos séricos relacionados ao estado hiperglicêmico e nos níveis de marcadores e enzimas hepáticas relacionados ao estresse oxidativo.

4. MATERIAIS

4.1. Material Vegetal

Folhas de *Moringa oleifera* Lam. (moringa) foram coletadas de plantas localizadas no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), em Fortaleza, Ceará, entre os meses de fevereiro de 2011 a janeiro de 2012. O número da exsicata da espécie, depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC), é EAC34591.

4.2. Eritrócitos

Eritrócitos utilizados nos ensaios de aglutinação foram obtidos de amostras de sangue de coelho albino adulto (linhagem Nova Zelândia), de camundongo albino Swiss e de rato albino Wistar, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

4.3. Animais

Camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*), com massa corpórea entre 30 e 50 g, foram utilizados nos experimentos *in vivo*. Os camundongos foram fornecidos pelo Biotério Central da UFC e mantidos no Biotério do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (UFC), em caixas de polipropileno contendo água e ração *ad libitum*, sob fotoperíodo de 12 h e temperatura de 22-25 °C. O estudo foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, com o protocolo de número 55/2012. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes para o cuidado de animais de laboratório preconizadas por essa Comissão.

O procedimento de eutanásia dos animais foi realizado após a execução dos protocolos experimentais, por meio da realização de deslocamento cervical.

4.4. Reagentes químicos

Acrilamida, ácido tiobarbitúrico, 2-mercaptoetanol, albumina sérica bovina, aloxano monohidratado, anticorpo anti-insulina humana produzido em frango, azul brilhante de

Coomassie G e R, azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), fenilmetanosulfonilfluorido (PMSF), guaiacol, *N,N'*-metileno bisacrilamida, *N,N,N',N'*-tetrametiletenodiamina (TEMED), pepsina, polivinilpirrolidona (PVP), 5- bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), azul de nitro tetrazólio (NBT), sulfato de amônio, 1,1,3,3 1,1,3,3-tetraetoxipropano e tripsina foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Persulfato de amônio e marcadores de massa molecular foram obtidos da GE Healthcare, USA.

Insulina e os demais reagentes de grau analítico foram obtidos comercialmente.

5. MÉTODOS

5.1. Obtenção de proteínas a partir de folhas de *M. oleifera*

5.1.1. Preparação da farinha

As folhas coletadas (limbo) de *M. oleifera* foram lavadas com água destilada para remoção de contaminantes e, em seguida, secadas em papel filtro. As folhas limpas e secas foram pulverizadas em nitrogênio líquido, com o objetivo de se obter uma farinha para otimizar a extração das proteínas. A farinha obtida foi imediatamente utilizada no processo de extração das proteínas.

5.1.2. Seleção do tampão de extração

Para estabelecer a melhor condição de extração das proteínas, a farinha das folhas de *M. oleifera* foi submetida à extração com diferentes tampões nas concentrações de 0,05 e 0,1 M e nos tempos de extração de 0,5 e 1 hora. Os tampões testados foram: acetato de sódio, pH 5,2; fosfato de potássio, pH 7,0 e Tris-HCl, pH 8,0. A cada um dos tampões foram acrescentados NaCl 0,15 M, PVP 2% (p/v), PMSF 0,001 M e EDTA 0,01 M, com o objetivo de melhorar a extração proteica, bem como de preservar a integridade das proteínas extraídas. A farinha das folhas foi macerada com os respectivos tampões extratores, na proporção de 1:5 (p/v), com o auxílio de cadinho e pistilo. O macerado obtido foi filtrado em pano de trama fina e, posteriormente, centrifugado a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O precipitado foi descartado e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para dosagem de proteínas.

5.1.3. Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas solúveis foi feita pelo método de Bradford (1976). A uma alíquota de 100 µL dos extratos, em diferentes tampões, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi levemente agitada e, após 10 minutos, foram realizadas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração foi estimada em relação a uma curva padrão, obtida utilizando diferentes concentrações de BSA.

5.1.4. Obtenção da fração proteica

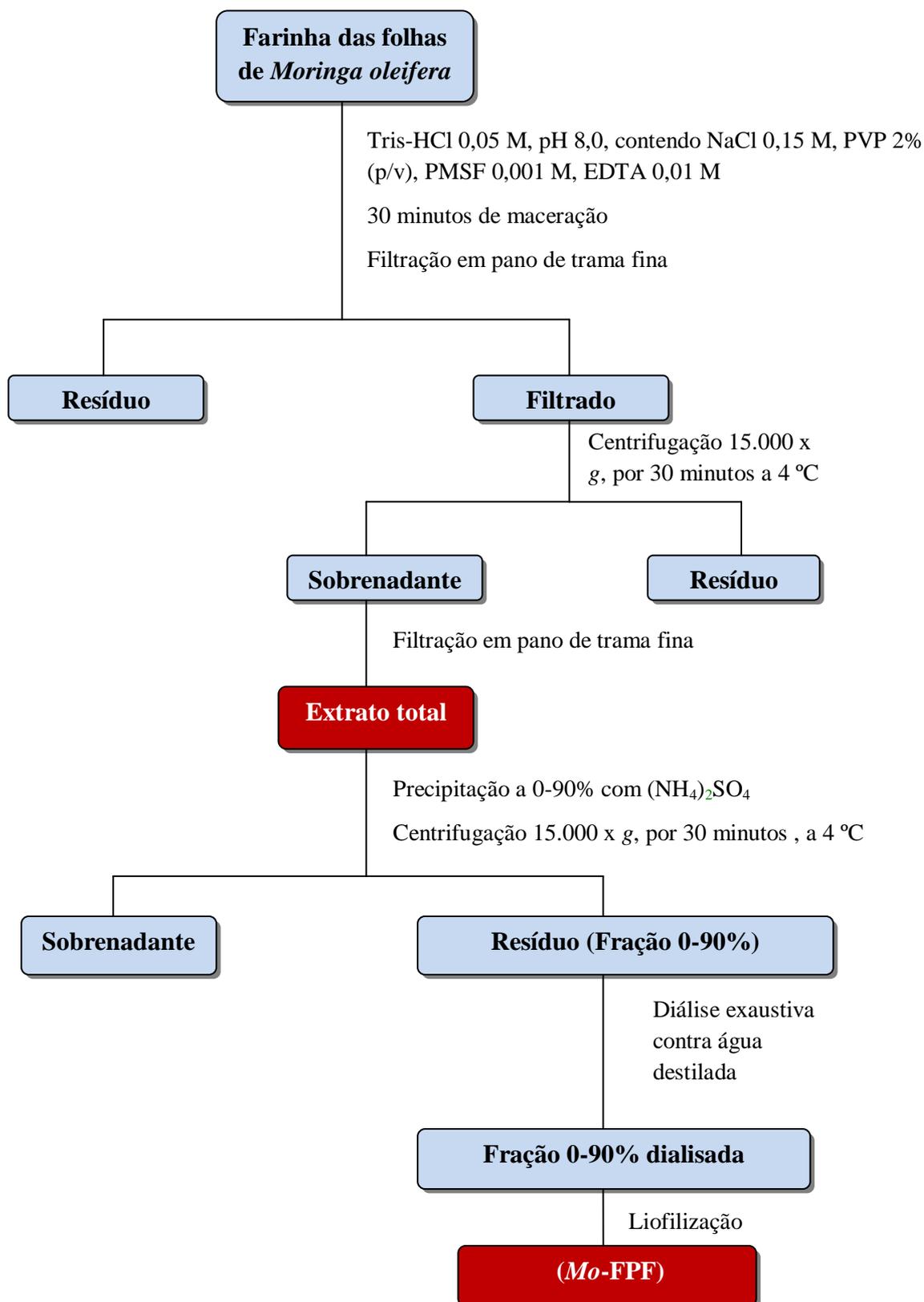
De acordo com os resultados obtidos no item 5.1.2, a farinha das folhas de *M. oleifera* foi submetida à extração em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, PVP 2% (p/v), PMSF 0,001 M e EDTA 0,01 M, por 30 minutos (proporção 1:5, p/v). O material obtido foi filtrado em pano de trama fina e o material filtrado centrifugado a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante coletado foi novamente filtrado em pano de trama fina, tendo sido o filtrado denominado de extrato total, a partir do qual foi realizada a dosagem de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976).

Em sequência, as proteínas do extrato total foram precipitadas pela adição de sulfato de amônio, na faixa de saturação de 0-90%. Após 12 horas, a suspensão foi centrifugada a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. Após descarte do sobrenadante, o material precipitado foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M e, em seguida, submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana com *cut-off* de 2 kDa. O material dialisado foi liofilizado, resultando a fração denominada *Mo*-FPF (*Mo*: *Moringa oleifera*; FPF: fração proteica de folhas), que foi armazenada a -20 °C até o uso nas análises posteriores (FIGURA 4).

5.1.5. Determinação de proteínas totais

Para determinação do nitrogênio total, a fração 0-90% foi submetida à digestão, de acordo com o método de Kjeldahl (AOAC, 1990), de modo que o nitrogênio orgânico fosse convertido em íons amônio. A porcentagem desses íons foi determinada através do ensaio fotocolorimétrico descrito por Baethgen e Alley (1986). Para isso, tubos de digestão contendo 0,02 g de *Mo*-FPF, 1,1 g de catalisador (sulfato de potássio, sulfato de cobre e selênio metálico, na proporção de 100:10:1, respectivamente) e 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram alocados em digestor, que foi programado para aumentos gradativos de temperatura de 100 até 400 °C (15 minutos a 100 °C, 15 minutos a 150 °C, 15 minutos a 250 °C, 30 minutos a 350 °C e 45 minutos a 400 °C), por um período de 2 horas. O material digerido, após resfriamento até 200 °C foi diluído 50 vezes em balão volumétrico. Alíquotas desse material foram tomadas, misturadas com soluções referentes à fotocolorimetria e submetidas às leituras das absorbâncias a 650 nm (espectrofotômetro tipo Novapesc II, Pharmacia).

FIGURA 4 – Fluxograma de obtenção do extrato total e da fração proteica 0-90% (*Mo*-FPF) a partir de folhas de *Moringa oleifera*.



Para quantificação de nitrogênio total, foi utilizada uma curva padrão, construída a partir de concentrações conhecidas de sulfato de amônio, tomando-se por base que 1 g de sulfato de amônio contém 212 mg de nitrogênio. Para a determinação de proteínas totais, o conteúdo de nitrogênio total foi multiplicado por 6,25, baseando-se no fato de que a maioria das proteínas apresenta um conteúdo de 16% de nitrogênio.

5.2. Caracterização bioquímica da *Mo*-FPF

5.2.1. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

Com o objetivo de verificar o perfil de proteínas presentes em *Mo*-FPF, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação contendo 12,5% de acrilamida e 1% de SDS foi confeccionado utilizando tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, enquanto que o gel de empilhamento, contendo 3,5% de acrilamida e 1% de SDS, foi preparado em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8. A fração proteica foi dissolvida em tampão de amostra, consistindo de Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, SDS 1%, glicerol 20%, com ou sem β -mercaptoetanol 1%. Também foi adicionado azul de bromofenol 0,1 %, que serviu como corante de rastreamento da eletroforese. *Mo*-FPF dissolvida no tampão de amostra foi, então, aquecida a 100 °C, por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 10.000 x g, por 5 minutos. A corrida eletroforética foi conduzida em sistema vertical descontínuo (MV10COMP, Biosystems), a uma voltagem de 200 V e amperagem de 20 mA. Como marcadores de massa molecular foram utilizados fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), albumina do ovo (45 kDa), anidrase carbônica bovina (29 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa). Foi realizada a impregnação das bandas proteicas com prata, sendo estas posteriormente visualizadas após incubação do gel em solução de carbonato de sódio, contendo tiosulfato de sódio e formaldeído, conforme descrito por Blum *et al.* (1987).

5.2.2. Digestibilidade in vitro de Mo-FPF

A digestibilidade *in vitro* de *Mo*-FPF foi avaliada utilizando-se proteases comumente encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos conforme ensaio protocolado por Sathe *et al.* (1997). Para a digestão por tripsina, alíquotas da solução da enzima, dissolvida em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, foi adicionada à solução de *Mo*-FPF (4 mg/mL) dissolvida no mesmo

tampão, de forma que a mistura reacional apresentasse uma proporção enzima:substrato de 1:10. A mistura foi incubada a 37 °C, deixada sob agitação, tendo sido retiradas alíquotas após 2 e 4 horas de digestão. Após isso, a reação foi interrompida pela adição de 5 µL de HCl 0,1 M. Essa mistura foi diluída em 15 µL de tampão de amostra (item 5.2.1), fervida por 10 minutos e, em seguida, centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram aplicadas em gel contendo 12,5% de poliacrilamida e SDS para a realização de eletroforese, a fim de ser observada a ocorrência ou não de digestão. Para a digestão por pepsina, foram utilizados os mesmos passos metodológicos, porém o meio reacional foi HCl 0,001 M e a solução de parada da reação foi NaOH 0,1 M. Albumina sérica bovina foi utilizada como proteína controle do processo de digestão.

5.2.3. Determinação de atividade hemaglutinante

Uma vez que vários trabalhos mostram o potencial hipoglicemiante de algumas lectinas, foi realizado um ensaio para avaliação da atividade hemaglutinante de *Mo*-FPF. Uma solução de *Mo*-FPF (6 mg/mL) foi submetida a diluições seriadas em tubos de ensaio, na presença de NaCl 0,15 M. A 200 µL de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias (2%), tratadas ou não com tripsina, obtidas de coelho, camundongo e rato. Os tubos foram incubados a 37 °C, por 30 minutos e deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g, por 30 segundos, à temperatura ambiente. A visualização de aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra que ainda foi capaz de aglutinar hemácias (MOREIRA; PERRONE, 1997).

A técnica utilizada para tratamento enzimático dos eritrócitos foi a descrita por Lis e Sharon (1972). Inicialmente, amostras contendo 1 mL de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 0,15 M e, em seguida, tripsina foi adicionada na proporção de 1 mg de enzima para 10 mL da suspensão de eritrócitos 2%. Essa suspensão foi incubada por 1 hora, a 4 °C, sob agitação ocasional e centrifugada a 3.000 x g, por 5 minutos. Os eritrócitos tratados foram novamente lavados com NaCl 0,15 M (6 vezes) e o *pellet* de células resultantes foi suspenso em um volume de NaCl 0,15 M suficiente para obtenção de hemácias a 2%.

5.2.4. Determinação de atividades antioxidantes *in vitro* de *Mo-FPF*

5.2.4.1. Determinação de atividade peroxidásica dependente de fenóis (POX)

A atividade peroxidásica dependente de fenóis foi avaliada segundo metodologia descrita por Urbanek, Kuzniak-Gebarowska e Herka (1991). Em tubos de ensaio, foram adicionados 900 μL de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, 500 μL de guaiacol e 500 μL de peróxido de hidrogênio, sendo os dois últimos reagentes compostos que atuam como agente redutor e oxidante da reação, respectivamente. Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, foram adicionados 100 μL da solução de *Mo-FPF* (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), dissolvida em Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. Aumento na leitura da absorbância a 480 nm, correspondente à formação de tetraguaiacol, o produto formado da oxidação do guaiacol, foi verificado (espectrofotômetro Novapesc II, Pharmacia). Os resultados foram expressos como $\Delta\text{abs}_{480\text{nm}}/\text{minuto}/\text{mL}$ (variação da absorbância lida em 480 nm/minuto/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.2.4.2. Determinação de atividade peroxidásica dependente de ascorbato (APX)

A avaliação da atividade de peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Peixoto *et al.* (1999). Em triplicata, foram adicionados, em tubos de ensaio, 800 μL de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,0, contendo 0,5 mM de ácido L-ascórbico e 100 μL de solução de *Mo-FPF* (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), dissolvida em Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. Após incubação dos tubos a 30 °C, por 10 minutos, foram adicionados à mistura reacional 100 μL de peróxido de hidrogênio 0,002 M e logo após foram realizadas as leituras das absorbâncias a 290 nm, em intervalos de 180 segundos. O índice de oxidação do ascorbato, representado pelos decréscimos dos valores de absorbância com o tempo, foi expresso como $\Delta\text{abs}_{290\text{nm}}/\text{minuto}/\text{mL}$ (variação da absorbância lida em 290 nm/minuto/mL). O ensaio foi realizado em triplicata.

5.2.4.3. Determinação de atividade catalásica (CAT)

A verificação de atividade catalásica foi realizada conforme descrito por Peixoto *et al.* (1999). Em tubos de ensaio foram adicionados 600 μL de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 200 μL de *Mo-FPF* (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e 100 μL de água deionizada. Após a adição de 100 μL de

peróxido de hidrogênio 112,5 mM, leituras das absorbâncias em 240 nm foram realizadas, acompanhando o decréscimo dos valores de absorbância em um intervalo de tempo de 60 segundos. De posse do valor de variação da absorbância, expresso em $\Delta\text{Abs}/\text{mL}/\text{minuto}$, foi utilizada a equação referente à lei de Lambert-Beer, com o objetivo de se obter o valor da concentração de H_2O_2 na cubeta de quartzo. A atividade catalásica foi expressa em μM de H_2O_2 consumido/minuto. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.2.5. *Dot Blot*

Mo-FPF foi avaliada quanto à presença de proteína(s) capaz(es) de ser(em) reconhecida(s) pelo anticorpo anti-insulina. Para isso, foi realizado um imunoenensaio utilizando o método de *Dot Blot* (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Vinte microlitros de *Mo*-FPF ($2\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram aplicados em membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Após a secagem da amostra, os sítios livres de ligação com proteínas foram bloqueados pela incubação da membrana, por 12 horas, com solução de bloqueio, consistindo de tampão TBS-T com 5% de leite desnatado (TBS-T: tampão Tris-salina contendo 0,05% de Tween20). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas com TBS-T e, então, incubadas, respectivamente, com soluções de anticorpo primário anti-insulina (em TBS-T contendo 1% de leite desnatado) diluído 250, 500 e 1000 vezes, por 3 horas, sob uma agitação leve. Em seguida, as membranas foram lavadas 5 vezes com tampão TBS-T e, após, incubadas com solução de anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, diluído 2000 vezes em TBS-T contendo 1% de leite desnatado, por 2 horas, à temperatura ambiente. Após lavagem com TBS-T, as membranas foram incubadas com a solução de revelação BCIP/NBT até o surgimento de coloração, com a reação interrompida pela lavagem com água deionizada. Foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, insulina humana recombinante e solução de bloqueio.

5.3. Ensaio *in vivo* para verificação de efeito hipoglicemiante de *Mo*-FPF

5.3.1. *Adaptação dos animais*

Os animais submetidos à avaliação do efeito hipoglicemiante de *Mo*-FPF foram, antes da realização dos experimentos, submetidos a um período de adaptação com o objetivo de minimizar o estresse decorrente da manipulação dos mesmos ao longo dos ensaios *in vivo*

e, assim, serem reduzidas as hiperglicemias decorrentes da liberação de hormônios contrareguladores. Para isso, foram realizadas manobras de contenção, pesagem, identificação e simulações das manipulações e procedimentos que ocorreriam nos dias dos experimentos, a fim de aclimatar os animais com tais manipulações. Os períodos de adaptação duraram entre 10 a 12 dias, em ambiente de máximo silêncio, tendo sido realizados por, no máximo, dois manipuladores, os quais foram os mesmos que participaram dos ensaios *in vivo*. A adaptação foi avaliada de forma subjetiva, tendo sido observadas a ocorrência de defecações e a tranquilidade dos animais durante os procedimentos de simulação (FIGURA 5).

5.3.2. Indução de diabetes experimental

A indução de diabetes experimental nos animais foi realizada pela administração, por via intraperitoneal, de aloxano monohidratado, uma pirimidina que destrói seletivamente as células β pancreáticas produtoras de insulina. Camundongos machos com massa corpórea entre 30 e 50 g foram deixados em jejum de pré-indução de 16 horas, após o que aloxano foi administrado na dose de 150 mg/Kg de peso corpóreo, diluído em NaCl 0,15 M (OZOUGWU, 2011). Após 72 horas da administração do agente diabetogênico, alíquotas de sangue, obtidas por incisão transversal da veia caudal, foram tomadas para a mensuração das glicemias em glucômetro portátil (Accu-Chek Active, Roche). Camundongos com glicemias ≥ 250 mg/dL foram considerados diabéticos e utilizados nos experimentos (FIGURA 6).

5.3.3. Prospecção de ação hipoglicemiante – teste de dose única

Para verificação do efeito agudo de *Mo*-FPF na glicemia de animais diabéticos, foram testadas as doses de 100, 300 e 500 mg *Mo*-FPF/Kg de peso corpóreo. A rota de administração inicialmente escolhida foi a intraperitoneal, considerando a natureza predominantemente proteica de *Mo*-FPF. Os outros grupos experimentais foram constituídos pelo controle positivo (animais tratados com 0,7 UI de insulina/Kg de peso corpóreo) e controle negativo (animais tratados com o veículo). Foram verificadas as glicemias antes do tratamento ($t = 0$ hora) e, também, 1, 3 e 5 horas após as administrações, com o auxílio de um glucômetro portátil (Accu-Chek Active, Roche, EUA), tendo sido as amostras de sangue obtidas da veia caudal. Cada grupo experimental foi constituído por 12 animais.

FIGURA 5 - Sequência de procedimentos executados diariamente durante o período de adaptação (10-12 dias) dos animais para posterior realização dos experimentos.

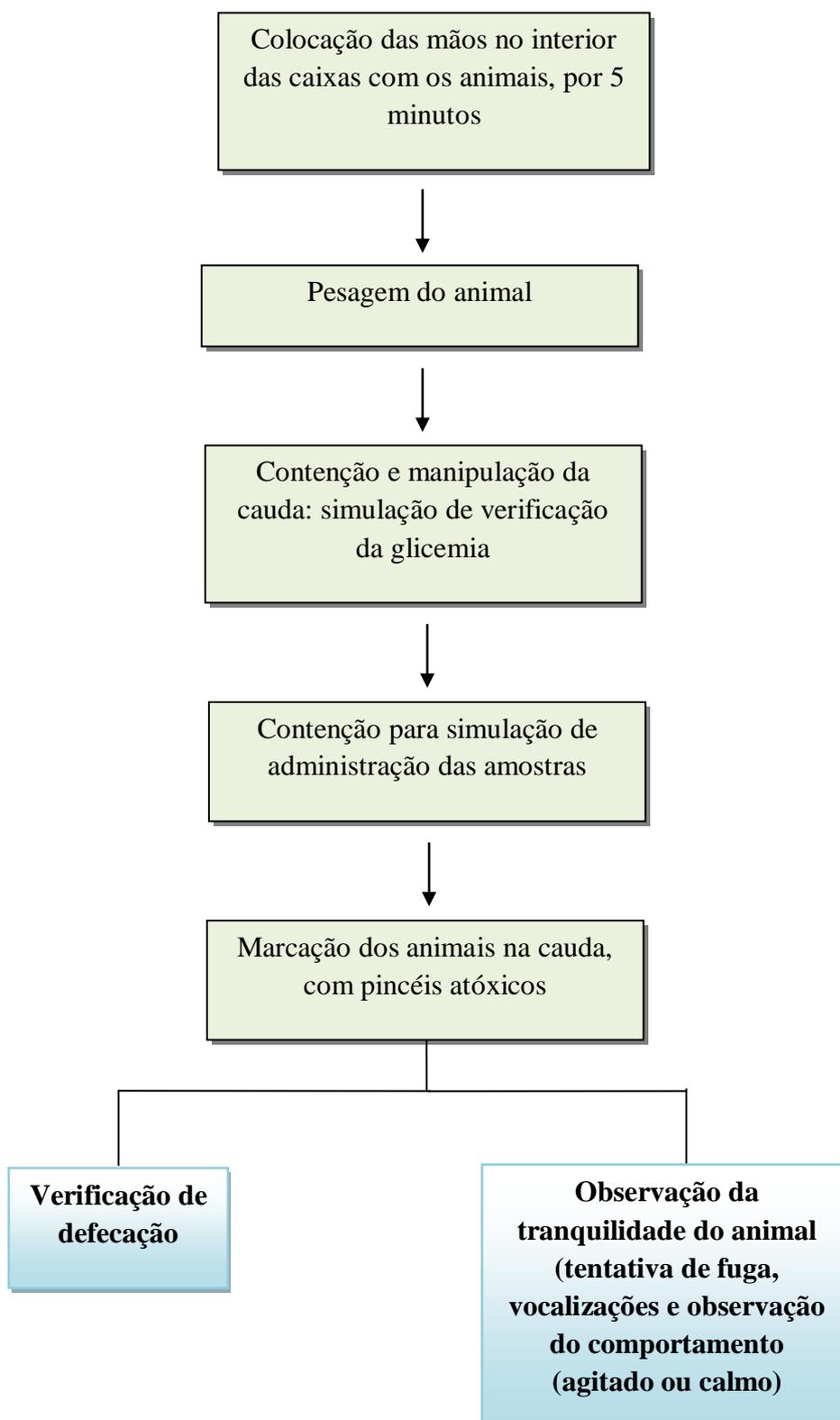
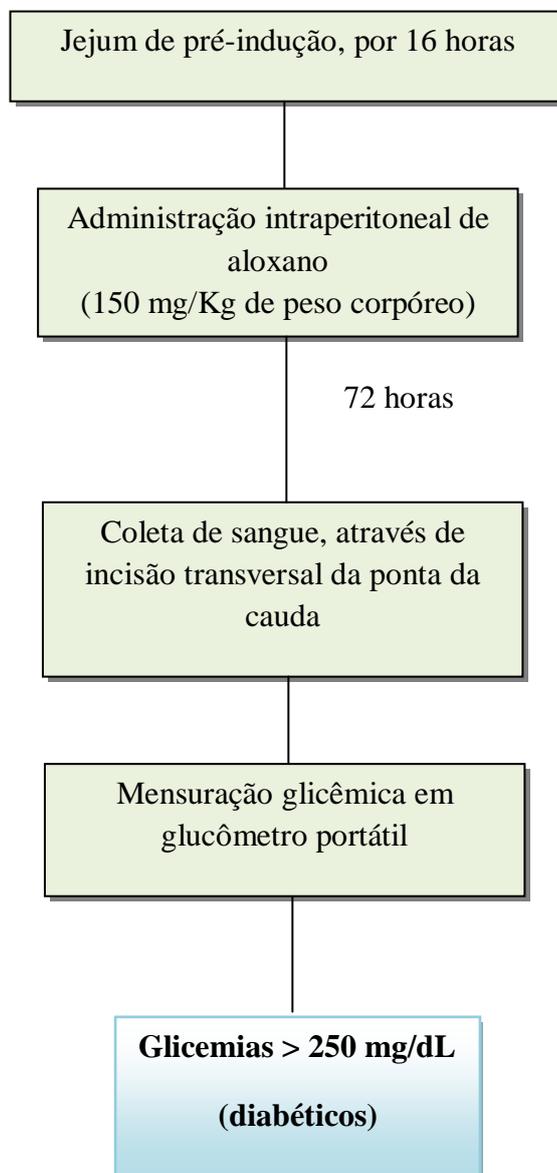


FIGURA 6 - Etapas utilizadas para indução química de diabetes por aloxano em camundongos.



5.3.4. Avaliação da natureza proteica do agente hipoglicemiante

Baseando-se nos resultados obtidos no item 5.3.3, foram realizados testes de dose única utilizando as vias intragástrica e intraperitoneal de administração, sendo essa última realizada através da administração de *Mo*-FPF previamente fervida por 1 hora, com o fim de serem obtidos dados que embasassem a natureza proteica do agente hipoglicemiante verificado. A dose de *Mo*-FPF utilizada foi a que produziu os melhores resultados de redução glicêmica verificada no ensaio referente ao item 5.3.3. Como controle positivo para a rota intragástrica de administração, foi utilizado o hipoglicemiante oral glibenclamida, na dose de 50 mg/Kg de peso corpóreo. Foram utilizados 12 animais por grupo.

5.3.5. Teste de doses repetidas

Baseando-se nos resultados obtidos nos itens 5.3.3 e 5.3.4 e, ainda, com o objetivo de verificar o efeito da administração crônica de *Mo*-FPF na glicemia de camundongos diabéticos, foram realizadas administrações intraperitoneais diárias de *Mo*-FPF, na dose de 500 mg/Kg, durante 20 dias, tendo as glicemias sido mensuradas em intervalos de três dias. Para a obtenção das alíquotas de sangue a serem usadas na mensuração glicêmica em glucômetro portátil, foi realizada uma incisão transversal da ponta da cauda no primeiro dia de experimento. Nos outros dias, o sangue foi obtido pela retirada manual da crosta de cicatrização formada. Foram utilizados 12 animais por grupo.

Parâmetros sintomatológicos do estado hiperglicêmico, como perda de peso, poliúria e polidipsia também foram analisados periodicamente. Assim, nos mesmos dias em que mensuradas as glicemias, foram procedidas análises dos pesos dos animais, da ingestão hídrica média e, ainda, avaliação visual da intensidade da umidade das maravalhas em decorrência da liberação de urina, em um período de 24 horas.

Ao final dos 20 dias de tratamento com *Mo*-FPF, os animais receberam anestesia inalatória com éter dietílico, de modo que amostras de sangue através de punção cardíaca fossem retiradas. Em seguida, foram eutanasiados para a realização do procedimento de necropsia e remoção dos fígados.

As amostras de sangue foram deixadas em repouso durante a noite, a 4 °C, para permitir a coagulação do sangue. Após centrifugação a 1000 x g, por 7 minutos, o sobrenadante (soro) foi coletado e a partir dele foram dosados colesterol total, HDL colesterol, triacilgliceróis, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT),

fosfatase alcalina, uréia, creatinina, proteínas totais e albumina. As análises foram feitas através da utilização de *kits* específicos obtidos comercialmente (Bioclin). LDL e VLDL foram mensurados a partir da equação de Friedewald (FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). Os fígados retirados foram utilizados na determinação do nível de peroxidação lipídica e de enzimas antioxidantes (item 5.3.6).

5.3.6. Determinação do estado oxidativo hepático

5.3.6.1. Determinação de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica hepática foi determinada através da mensuração de malondialdeído (MDA), uma espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico, seguindo metodologia de Agar *et al.* (1999). Para isso, homogenatos a 10% do fígado, feitos com cloreto de potássio 10%, foram incubados a 37 °C, por 1 hora e, em seguida, adicionados de 400 µL de ácido perclórico 35%. Após centrifugação a 8.300 x g, por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e a ele 200 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2% foram adicionados. As amostras foram novamente incubadas a 95 °C, por 30 minutos e alíquotas retiradas para leitura da absorbância a 532 nm, em leitora de microplacas (*Expert Plus*, Analítica, Brasil). Através de uma curva padrão utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano, os resultados foram expressos como micromols de MDA por grama de tecido (µmol/g tecido).

5.3.6.2. Determinação de superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada como descrito por Beauchamp e Fridovich (1971). O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, para obtenção de um homogenato a 10%, o qual foi centrifugado a 8.300 x g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente (20 minutos, 12.000 x g, a 4 °C). Numa câmara escura, foram misturados 1 mL do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50 mM, EDTA 100 nM e L-metionina 13 mM, pH 7,8), 10 µL da amostra (sobrenadante), 150 µL de NBT 750 µM e 300 µL de riboflavina 2µM. Os tubos contendo a solução foram expostos a lâmpada fluorescente (15 W) por 15 minutos. A absorbância foi medida a 560 nm. Os resultados foram expressos em unidades da enzima/µg de proteína, que corresponde à razão entre a quantidade de SOD necessária para inibir a

redução do NBT em 50%. A quantidade de proteína dos homogenatos foi determinada pelo método de Bradford (1976).

5.3.6.3. *Determinação de catalase*

A atividade catalásica foi medida de acordo com o método descrito por Aebi (1984). A 20 μ L do homogenato do fígado a 5% em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo H₂O₂ 10 mM. Em seguida, foram efetuadas leituras em espectrofotômetro a 230 nm. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 nmol de H₂O₂ por minuto, a 25 °C. Os resultados foram expressos como milimol por minuto por grama de tecido (mmol/min/g tecido).

5.3.6.4. *Determinação de óxido nítrico*

Os níveis teciduais de óxido nítrico foram medidos como níveis totais de nitrato/nitrito com uso do reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Os tecidos hepáticos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, para obtenção de um homogenato a 10% e centrifugados a 11.000 x g, por 15 minutos, a 4 °C. Cem microlitros do sobrenadante foram misturados a 100 μ L do reagente de Griess (cloreto de naftiletlenodiamina 0,1% e sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) e, após 10 minutos, a absorbância foi medida a 540 nm. A curva padrão foi obtida usando nitrito de sódio. Os resultados foram expressos como micromoles nitrato/nitrito por grama de proteína. A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976).

5.4. Toxicidade aguda

Para avaliação da toxicidade aguda, foi administrada uma dose cinco vezes maior que aquela testada no estudo de dose crônica. Foram analisados ocorrência de mortalidade e sinais de toxicidade, tais como piloereção, sialorréia, diarreia, tremores, alteração do equilíbrio, convulsões, hiperexcitabilidade, prostração e outros sinais em intervalos de 1 a 4 horas e, então, novamente analisados 24 e 72 horas após a administração. Um grupo de 8 camundongos machos, pesando entre 30 e 50 g, foram utilizados para a realização desse experimento (ANVISA, 2004; JAISWAL *et al.*, 2009).

5.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As comparações estatísticas foram feitas pela aplicação de ANOVA *one way* seguida pelo teste *post hoc* de comparação múltipla de Tukey-Kramer. Os dados foram analisados com o programa GraphPad Prism versão 5.01 para Windows. Diferenças que mostraram um valor de p de 0,05 ou menos foram consideradas estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

6.1. Obtenção de proteínas a partir de folhas de *M. oleifera*

A TABELA 4 mostra a concentração de proteínas solúveis presentes nos extratos totais obtidos através da utilização dos tampões acetato de sódio pH 5,2, fosfato de potássio pH 7,0 e Tris-HCl pH 8,0, nas concentrações de 0,05 e 0,1 M e nos tempos de extração de 0,5 e 1 hora. Em geral, a utilização do tampão Tris-HCl pH 8,0 resultou em uma maior quantidade de proteínas extraídas em comparação com os outros tampões. Como a eficiência de extração desse tampão foi muito similar nas concentrações de 0,05 e 0,1 M e nos tempos de extração testados, o tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, e o tempo de maceração de 0,5 hora foram selecionados para obtenção do extrato total.

Para obtenção da fração proteica, o extrato total foi submetido à precipitação com sulfato de amônio na faixa de saturação de 0-90% que, após diálise e liofilização, resultou na fração denominada *Mo*-FPF. A concentração de proteínas e o rendimento proteico ao longo das etapas de obtenção de *Mo*-FPF estão mostrados na TABELA 5. O extrato total apresentou uma quantidade de proteínas solúveis de $8,60 \pm 0,90$ mgP/gF. O rendimento do material proteico resultante da precipitação do extrato total com sulfato de amônio (fração 0-90%) foi de 70,3%, ou seja, $6,05 \pm 0,10$ mgP/gF. A diálise contra água destilada, para remoção do sal, seguida da liofilização acarretou na redução do teor proteico para $4,96 \pm 0,33$ mgP/gF, correspondendo a um rendimento proteico de 57,5%. O percentual proteico de *Mo*-FPF, calculado a partir da determinação de nitrogênio total, foi de $70,8 \pm 5,79\%$.

6.2. Caracterização bioquímica da *Mo*-FPF

A FIGURA 7 mostra o perfil eletroforético das proteínas presentes em *Mo*-FPF, na ausência e presença do agente redutor. Em geral, os perfis são bem parecidos, independentemente do β -mercaptoetanol ter sido adicionado ou não. Uma diversidade de bandas proteicas é observada, a maioria delas apresentando massa molecular aparente acima de 29 kDa e uma única banda na região de 19 kDa.

TABELA 4 - Proteínas solúveis presentes nos extratos totais obtidos com diferentes tampões e tempos de extração

Tampão^a	Tempo de extração (h)	Proteína (mg/mL)^b
Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2	0,5	0,23 ± 0,02
Acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2	1,0	0,44 ± 0,02
Acetato de sódio 0,1 M, pH 5,2	0,5	0,32 ± 0,01
Acetato de sódio 0,1 M, pH 5,2	1,0	0,41 ± 0,03
Fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0	0,5	0,98 ± 0,02
Fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,0	1,0	1,20 ± 0,02
Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	0,5	0,77 ± 0,02
Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0	1,0	1,00 ± 0,02
Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0	0,5	3,40 ± 0,02
Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0	1,0	3,20 ± 0,02
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0	0,5	2,90 ± 0,03
Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0	1,0	3,40 ± 0,02

Valores expressos como média ± desvio padrão.

^aTodos os tampões testados continham NaCl 0,15 M, PVP 2% (p/v), PMSF 0,001 M e EDTA 0,01 M.

^bValores obtidos através de dosagem pelo método de Bradford (1976).

TABELA 5 - Teor de proteínas e rendimento proteico ao longo das etapas de obtenção da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF)

Etapas^a	Proteína (mg/gF)^b	Rendimento (%)^c
Extrato total	8,60 ± 0,90	100,0
Fração 0-90% não dialisada	6,05 ± 0,10	70,3
Fração 0-90% liofilizada (MoFPF)	4,96 ± 0,33	57,5

Valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos similares.

^a Etapas de obtenção de Mo-FPF.

^b Quantidade de proteína recuperada (mg) em cada etapa por grama de folhas de *M. oleifera*.

^c Rendimento proteico obtido em cada etapa, considerando o extrato total como 100%.

Quando analisado o comportamento da *Mo*-FPF frente a proteases, as proteínas presentes nessa fração mostraram-se digeríveis por enzimas encontradas no trato digestório de animais monogástricos. Após 2 horas de incubação com pepsina, nas condições ideais para a hidrólise enzimática, praticamente todas as proteínas da *Mo*-FPF com massa molecular aparente acima de 29 kDa foram parcialmente hidrolisadas, sendo totalmente digeridas após 4 horas de incubação com a enzima. Porém, a proteína correspondente à massa molecular aparente de 19,0 kDa mostrou-se mais resistente à digestão por pepsina, uma vez que após 2 horas de contato com a enzima a intensidade da banda proteica correspondente permaneceu praticamente inalterada, diminuindo somente após 4 horas de incubação com a pepsina (FIGURA 8). Por outro lado, a albumina sérica bovina (BSA), utilizada como controle, aparentemente teve digestão total com apenas 2 horas de incubação com a pepsina.

O contato com tripsina promoveu aparentemente a completa digestão das proteínas da *Mo*-FPF, já nas primeiras 2 horas de incubação, incluindo a banda de massa molecular aparente de 19,0 kDa, que mostrou ser mais resistente à digestão péptica. A digestão da BSA por tripsina indicou que a enzima se encontrava ativa nas condições experimentais utilizadas (FIGURA 9).

Mo-FPF não foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelhos, tratados ou não com tripsina. No entanto, essa fração promoveu a aglutinação dos eritrócitos de ratos e camundongos, não tendo a atividade hemaglutinante sido influenciada pelo tratamento dos eritrócitos com tripsina (TABELA 6).

Com relação às atividades antioxidantes *in vitro*, *Mo*-FPF apresentou atividade peroxidásica guaiacol-dependente (FIGURA 10), mas não mostrou ter atividade peroxidásica dependente de ascorbato (FIGURA 11) e nem catalásica (FIGURA 12). Os valores de absorvância semelhantes a 290 nm verificadas para *Mo*-FPF e para o controle negativo feito com água deionizada mostraram que a oxidação do ascorbato verificada para *Mo*-FPF não foi devido à ação de suas proteínas, tratando-se, na verdade, de uma oxidação natural do ascorbato ao longo do tempo. Da mesma forma, o ensaio de atividade catalásica mostrou que a diminuição das concentrações de H_2O_2 pela adição de *Mo*-FPF, verificadas pelas leituras a 240 nm, tratou-se de uma dismutação natural do H_2O_2 , além do que tais resultados foram significativamente menores do que o controle positivo feito com a catalase pura.

FIGURA 8 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) da fração protéica de folhas de *Moringa oleifera* (*Mo*-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%) e submetida à digestão enzimática com pepsina. *Mo*-FPF foi dissolvida em HCl 0,001 M e incubada com pepsina a 37 °C, na proporção enzima:substrato de 1:10. Alíquotas correspondentes ao tempo de 2 e 4 horas de incubação foram retiradas e submetidas à PAGE-SDS. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle positivo. A quantidade de *Mo*-FPF e de BSA aplicadas nos poços foi de 13 µg. M: marcadores de massa molecular.

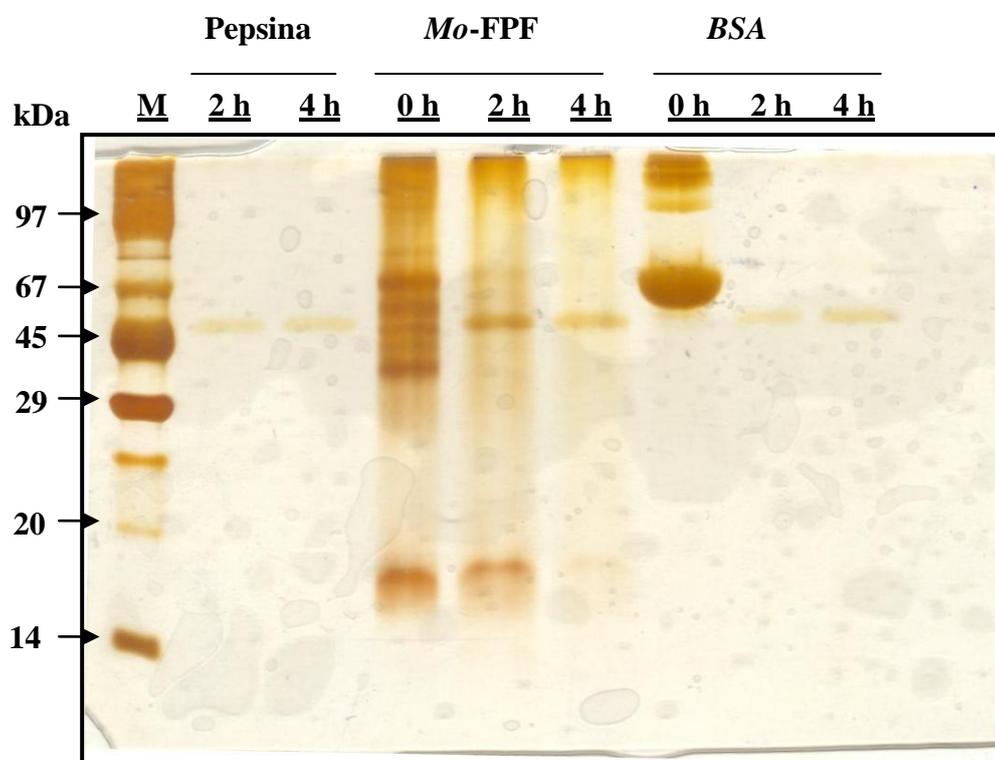


FIGURA 9 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (12,5%) da fração protéica de folhas de *Moringa oleifera* (*Mo*-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%) e submetida à digestão enzimática com tripsina. *Mo*-FPF foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, e incubada com tripsina a 37 °C, na proporção enzima:substrato de 1:10. Alíquotas correspondentes ao tempo de 2 horas e de 4 horas de incubação foram retiradas e submetidas à PAGE-SDS. Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como controle positivo. A quantidade de *Mo*-FPF e de BSA aplicadas nos poços foi de 13 µg. M: marcadores de massa molecular.

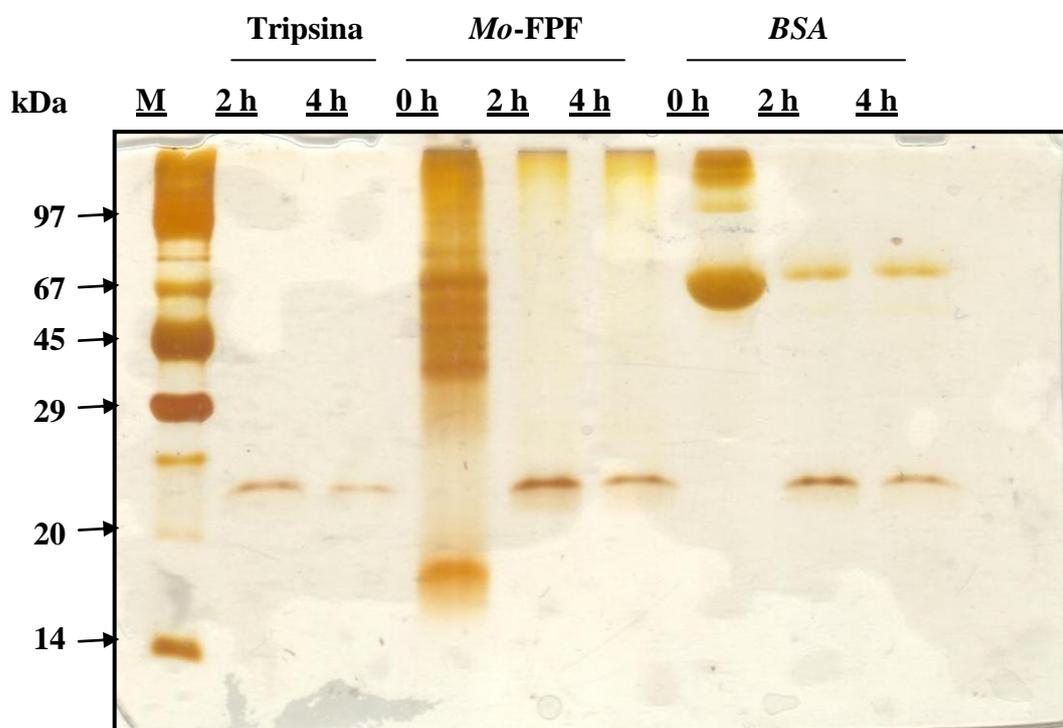


TABELA 6 - Determinação de atividade hemaglutinante da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-PFL), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%)

Animal	Eritrócito (tripsinizado)	Eritrócito (não tripsinizado)	UH^a
Coelho (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	-	-	ND
Rato (<i>Rattus norvegicus</i>)	+	+	8,0
Camundongo (<i>Mus musculus</i>)	+	+	16,0

^a Unidades de Hemaglutinação. Valor expresso como o inverso do título da maior diluição na base 2 que ainda foi capaz de promover aglutinação visível dos eritrócitos a olho nu.

FIGURA 10 - Atividade peroxidásica dependente de guaicol (POX) da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), expressa como a variação da absorvância a 480 nm por minuto e por mL de amostra (0,06 mgP). O símbolo *** representa valores que diferiram em relação ao controle feito com água deionizada ($p < 0,001$).

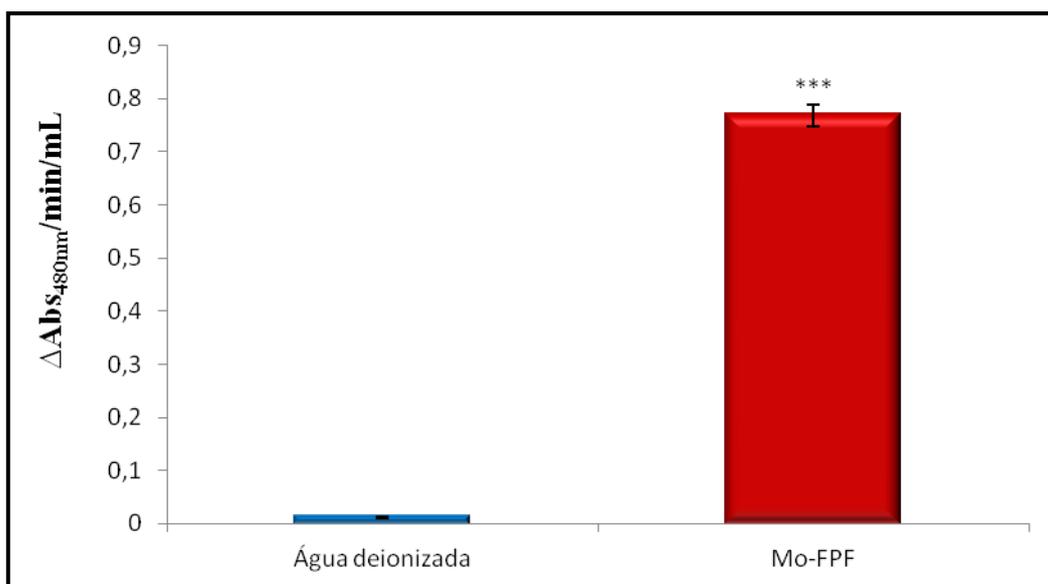


FIGURA 11 - Atividade peroxidásica dependente de ascorbato (APX) da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), expressa como a variação da absorbância a 290 nm por minuto e por mL de amostra (0,06 mgP). Como controle negativo foi utilizada água deionizada.

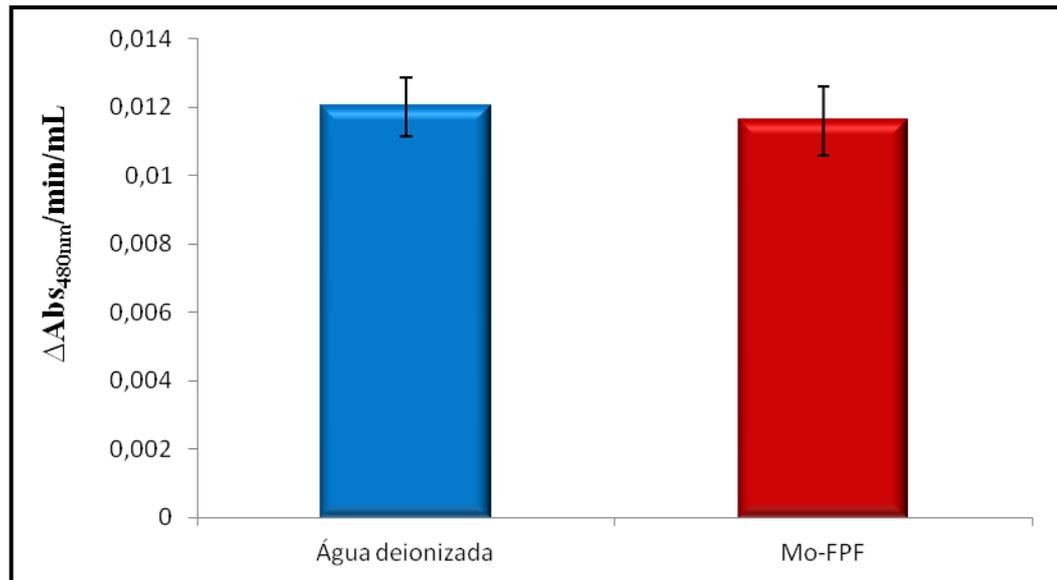
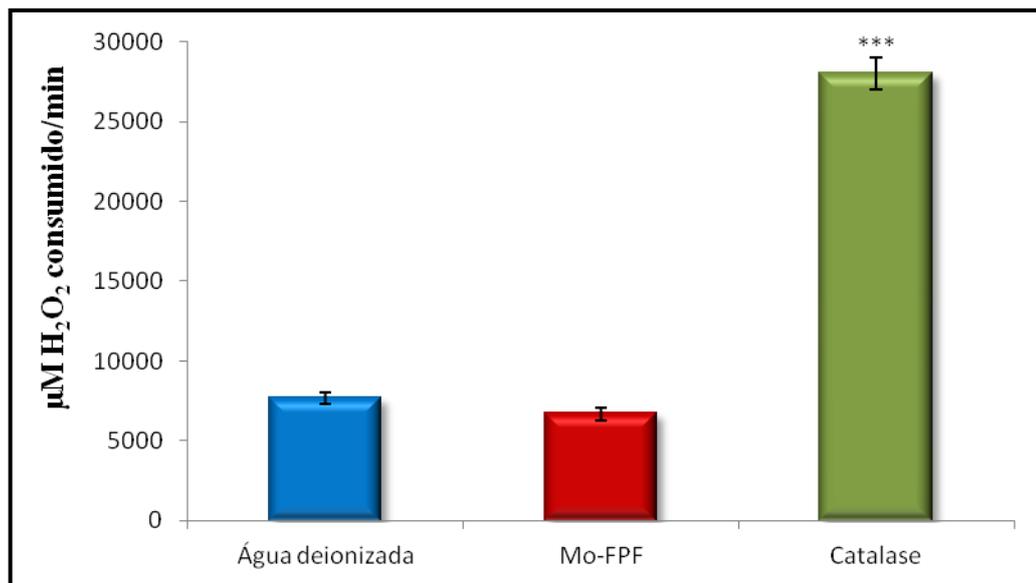


FIGURA 12 - Atividade catalásica (CAT) da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), expressa em micromoles de H₂O₂ consumido por minuto. O símbolo *** representa os valores que diferiram em relação ao controle feito com água deionizada ($p < 0,001$).



A FIGURA 13 mostra os resultados da avaliação de reação cruzada entre *Mo*-FPF e o anticorpo anti-insulina humana, por meio da realização de *Dot Blot*. Nas três diluições de anticorpo utilizadas (1:250, 1:500 e 1:1000), foi possível a observação de reação cruzada, através do surgimento de cor na membrana de PVDF, resultante da reação redox do substrato BCIP/NBT, indicando que o anticorpo primário anti-insulina reconheceu epítomos antigênicos do tipo insulina presentes em *Mo*-FPF.

6.3. Ensaios *in vivo* para verificação de efeito hipoglicemiante da *Mo*-FPF

A FIGURA 14 mostra os resultados obtidos após a administração intraperitoneal de *Mo*-FPF, nas doses de 100, 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo, em camundongos diabéticos. Não houve diferença estatística entre o grupo tratado com a dose de 100 mg/Kg de peso corpóreo e o controle diabético tratado com o veículo (Tris-HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5) em nenhum período após administração. Já no tempo de 1 hora após a administração, as doses de 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo resultaram em glicemias significativamente menores quando comparadas ao controle diabético. O efeito hipoglicêmico foi ainda mais evidente nos tempos de 3 e 5 horas após a administração. Insulina recombinante humana de ação rápida (insulina asparte, NovoNordisk®, Brasil), na dose de 0,7 UI/Kg de peso corpóreo, foi utilizada como controle positivo. As percentagens de redução ou aumento da glicemia de todos os tratamentos em relação ao tempo 0 hora estão mostradas na FIGURA 15. As doses de 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo produziram, nos tempos de 1, 3 e 5 horas após a administração, reduções glicêmicas de aproximadamente 3, 36 e 38% e de 10, 53 e 60%, respectivamente.

A administração por via intragástrica de *Mo*-FPF, na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, não resultou em glicemias estatisticamente diferentes das do controle diabético nos três tempos de mensuração (FIGURA 16). Da mesma forma, a administração intraperitoneal da mesma dose de *Mo*-FPF, previamente fervida por 1 hora, não resultou em glicemias diferentes das observadas no controle diabético, exceto no tempo $t = 5$ horas (FIGURA 17).

FIGURA 13 - *Dot Blot* realizado para detecção de proteínas do tipo insulina na fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (*Mo-FPF*), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%). Solução de bloqueio (TBS com 5% de leite desnatado e 0,05% de Tween20) e insulina recombinante humana foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

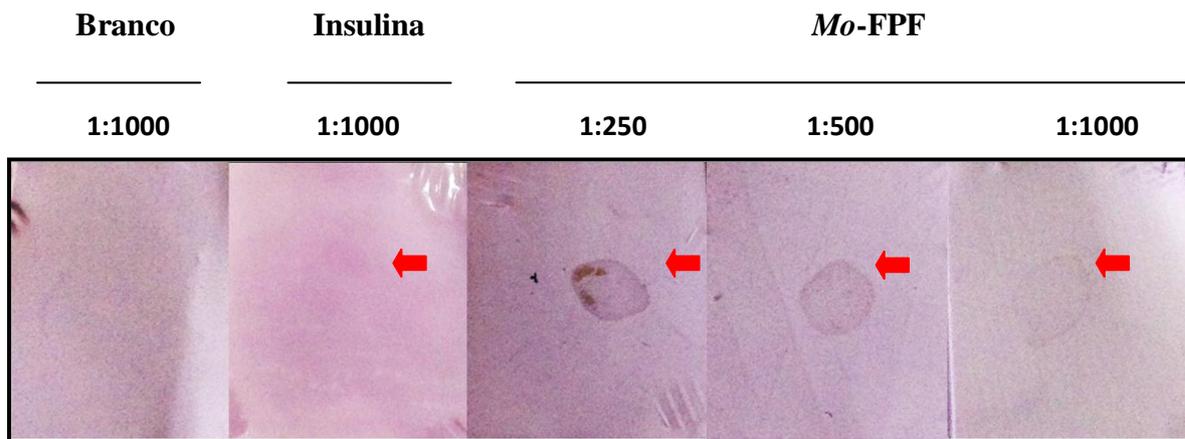


FIGURA 14 - Efeito da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na glicemia de animais diabéticos. Doses de 100, 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo de Mo-FPF foram administradas intraperitonealmente em camundongos. No controle diabético, foi administrado apenas o veículo (Tris-HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). Insulina recombinante humana aspártica, na dose de 0,7 UI/Kg de peso corpóreo, foi utilizada como controle positivo. ** e *** representam $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao controle diabético, respectivamente.

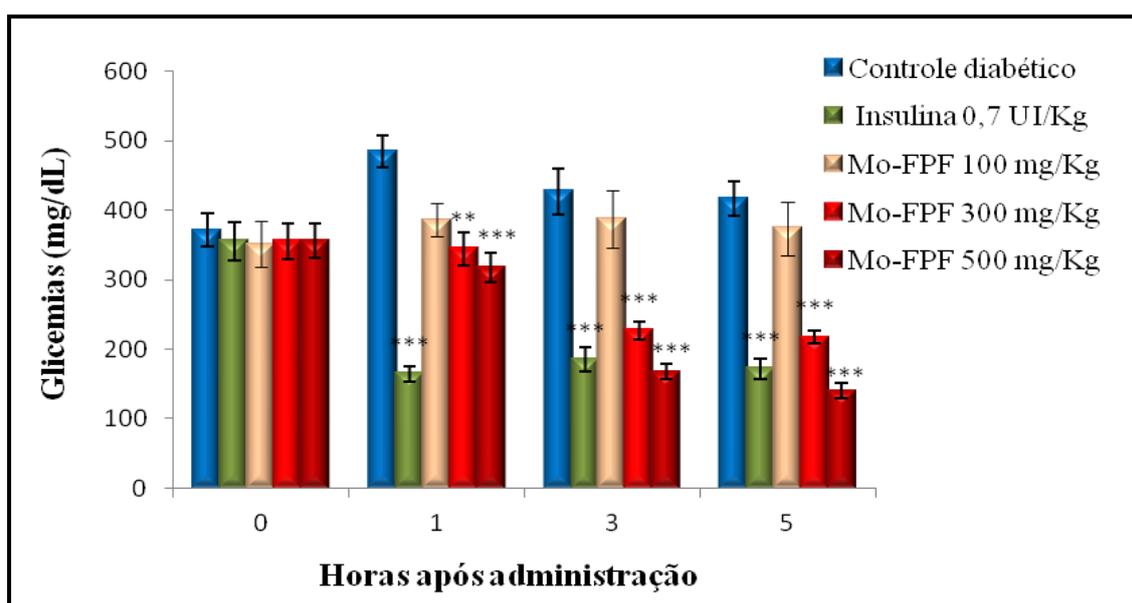


FIGURA 15 - Percentual de aumento ou redução glicêmica da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), quando administrada intraperitonealmente, nas doses de 100, 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo, em camundongos diabéticos, em relação à glicemia mensurada antes do tratamento (t = 0 hora). No controle diabético, foi administrado apenas o veículo (Tris-HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). Insulina recombinante humana aspártica, na dose de 0,7 UI/Kg de peso corpóreo, foi utilizada como controle positivo.

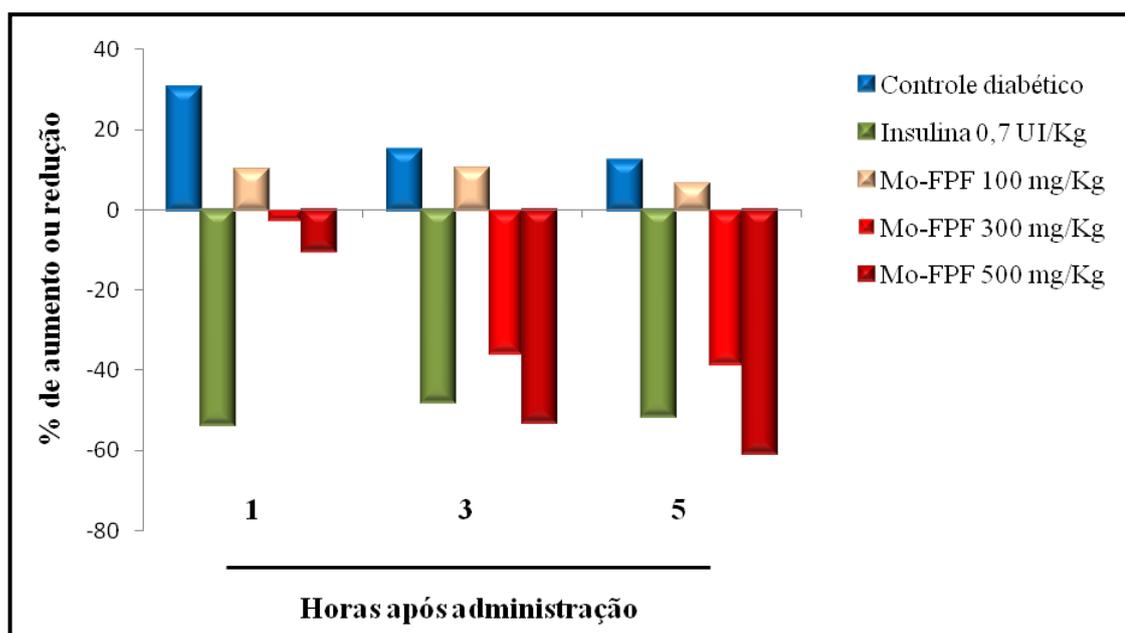


FIGURA 16 – Efeito da administração intragástrica da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, na glicemia de camundongos diabéticos. No controle diabético, foi administrado apenas o veículo (Tris-HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). Como controle positivo, foi utilizado o hipoglicemiante oral glibenclamida, na dose de 50 mg/Kg de peso corpóreo. * e ** representam $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao controle diabético, respectivamente.

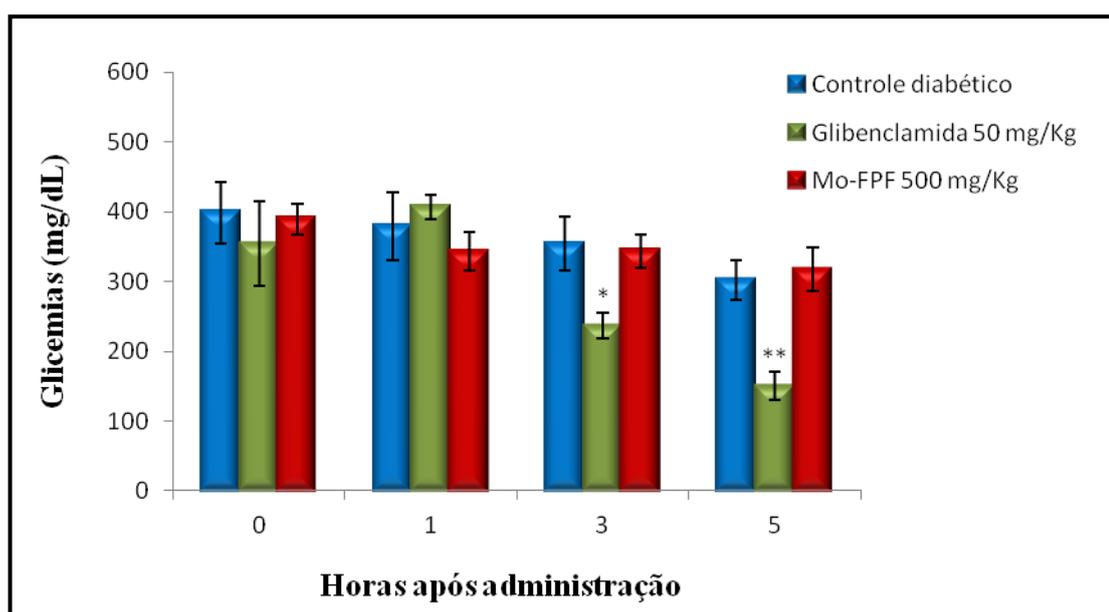
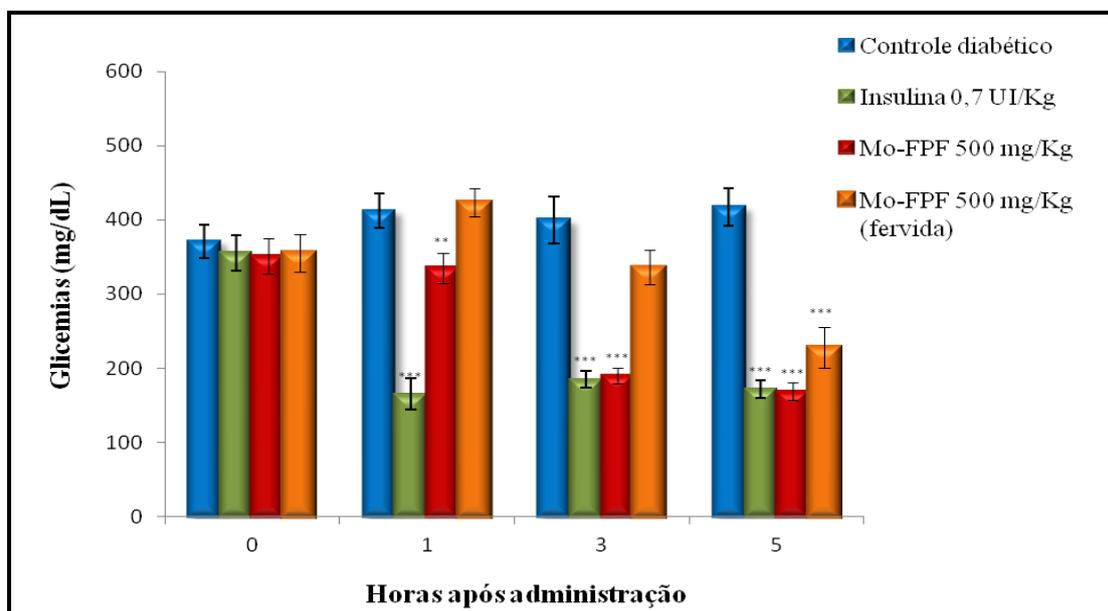


FIGURA 17 - Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), previamente fervida por 1 hora, na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a glicemia de camundongos diabéticos. No controle diabético, foi administrado apenas o veículo (Tris-HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). Insulina recombinante humana aspártica, na dose de 0,7 UI/Kg de peso corpóreo, foi utilizada como controle positivo. Valores expressos como média \pm desvio padrão. ** e *** representam $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao controle diabético, respectivamente.



O tratamento crônico com *Mo*-FPF, durante 20 dias, no qual a dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo foi administrada diariamente, pela via intraperitoneal, resultou em glicemias significativamente menores quando comparadas ao controle diabético, em todas as mensurações realizadas. Em relação ao controle não diabético, as glicemias do grupo tratado com *Mo*-FPF não foram diferentes nos 7°, 16° e 20° dias de tratamento. Insulina recombinante humana de ação lenta (insulina glargina, Sanofi-Aventis, Brasil), na dose de 5 UI/Kg de peso corpóreo, foi utilizada como controle positivo (FIGURA 18). Em relação à glicemia mensurada antes da administração da primeira dose dos tratamentos, *Mo*-FPF promoveu, no 4°, 7°, 10°, 13°, 16° e 20° dias de tratamento, reduções glicêmicas de 31, 50, 35, 11, 44 e 57%, respectivamente (FIGURA 19).

Com relação à sintomatologia relacionada ao estado hiperglicêmico, o tratamento diário com *Mo*-FPF amenizou a polidipsia (FIGURA 20) e a poliúria (FIGURA 21) evidentemente observadas no controle diabético. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à massa corpórea, em todos os dias em que ela foi mensurada (FIGURA 22).

Mo-FPF, administrada durante 20 dias, resultou em níveis séricos de colesterol total e da fração lipoproteica de baixa densidade (LDL) estatisticamente menores do que os observados nos controles diabético e não diabético. A fração HDL, VLDL e os triacilgliceróis séricos, contudo, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais (TABELA 7). Em relação aos outros parâmetros séricos mensurados, incluindo aminotransferases, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, proteínas totais e albumina, também não houve diferença entre os diferentes tratamentos (TABELA 8).

Além do efeito hipoglicemiante e hipocolesterolemiantes, *Mo*-FPF também exerceu efeito protetor contra a peroxidação lipídica hepática. Os níveis de um marcador bioquímico desse processo (malondialdeído) no grupo diabético tratado com *Mo*-FPF não foram diferentes em relação ao controle normal, mas foram menores quando comparados ao controle diabético. Insulina, no entanto, não exerceu tal efeito protetor (FIGURA 23). Os níveis de catalase hepática foram significativamente maiores no grupo diabético tratado com *Mo*-FPF em relação aos outros grupos e, entre esses últimos, não houve diferença estatística nos níveis dessa enzima (FIGURA 24). Em relação à superóxido dismutase (SOD), houve um decréscimo significativo nos níveis hepáticos dessa enzima nos grupos controle diabético e diabético tratado com *Mo*-FPF, em comparação com o grupo controle não diabético. No tratamento com insulina, essa redução acentuada nos níveis de SOD não foi verificada, estando os valores mais próximos daqueles verificados com o controle não diabético, tendo,

no entanto, se mostrado significativamente diferentes (FIGURA 25). O grupo diabético tratado com *Mo*-FPF apresentou níveis hepáticos de óxido nítrico similares aos do controle diabético, os quais foram estatisticamente menores em relação aos verificados no tratamento com insulina e no controle não diabético (FIGURA 26).

FIGURA 18 – Efeito do tratamento diário da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (*Mo*-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), durante 20 dias, na glicemia de camundongos diabéticos. *Mo*-FPF foi administrada pela via intraperitoneal na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo. Valores expressos como média \pm desvio padrão. A glicemia do dia 1 é referente à mensuração realizada antes da administração do primeira dose dos tratamentos. No controle diabético, foi administrado apenas o veículo (Tris HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). Insulina recombinante humana glargina, foi utilizada como controle positivo. *** representa $p < 0,001$ em relação ao controle diabético e # e ### representam $p < 0,05$ e $p < 0,001$ em relação ao controle não diabético, respectivamente.

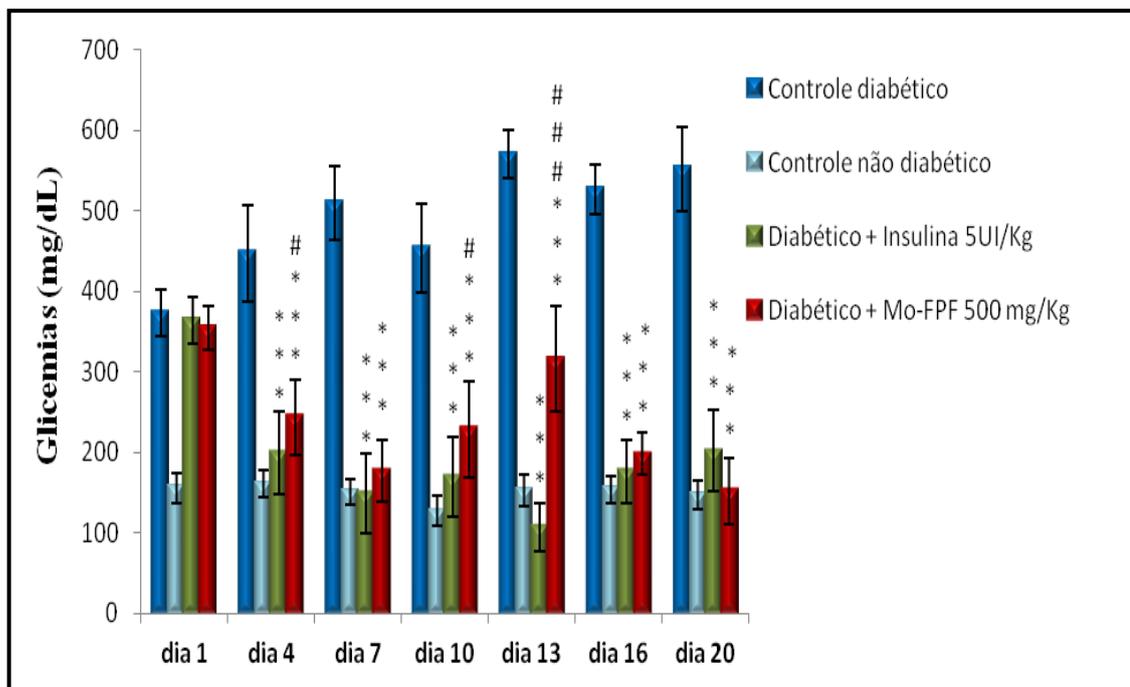


FIGURA 19 – Percentual de aumento ou redução das glicemias, em relação à glicemia inicial, mensurada antes da administração da primeira dose dos tratamentos, ao longo dos 20 dias de tratamento com a fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, em camundongos diabéticos. No controle diabético, foi administrado apenas o veículo (Tris HCl 0,025 M, contendo NaCl 0,15 M, pH 7,5). Insulina recombinante humana glargina, na dose de 5 UI/Kg de peso corpóreo, foi utilizada como controle positivo.

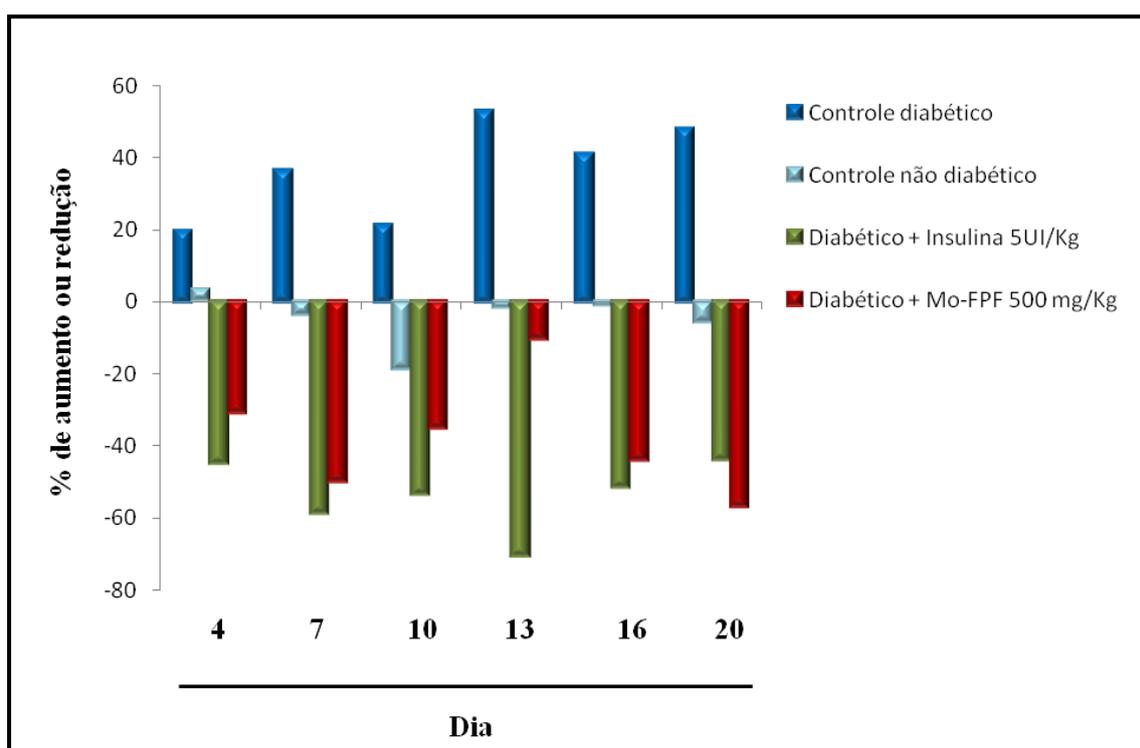


FIGURA 20 – Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a ingestão hídrica de camundongos diabéticos no período de 24 horas e ao longo de 20 dias de tratamento. Os valores, dados em mL de água ingerida/100 g de animal, foram calculados pela fórmula $(V_1 - V_2)/M \times 100$, onde V_1 = volume de água fornecido; V_2 = volume de água restante na mamadeira; M = soma das massas corpóreas dos animais.

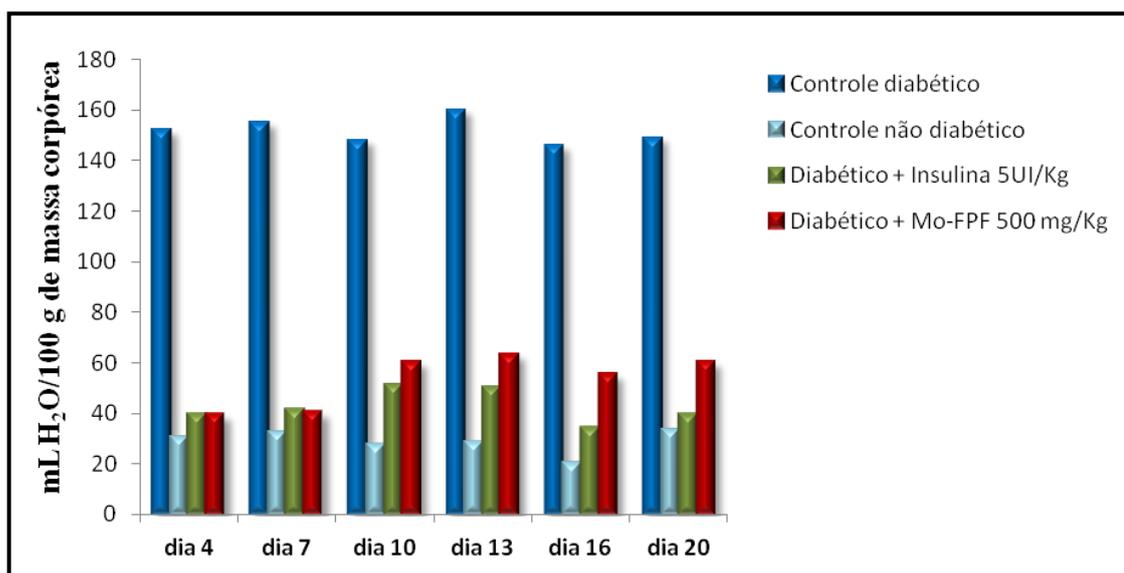


FIGURA 21 – Efeito da administração da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (*Mo-FPF*), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na taxa de micção, em 24 horas, verificado pela observação visual da umidade das maravalhas. **A** – controle diabético; **B** – Controle não diabético; **C** – Diabético tratado com insulina glargina de ação lenta (5 UI/Kg de peso corpóreo); **D** – Diabético tratado com *Mo-FPF* (500 mg/Kg de peso corpóreo). Imagens obtidas no 20º dia do teste de doses repetidas.

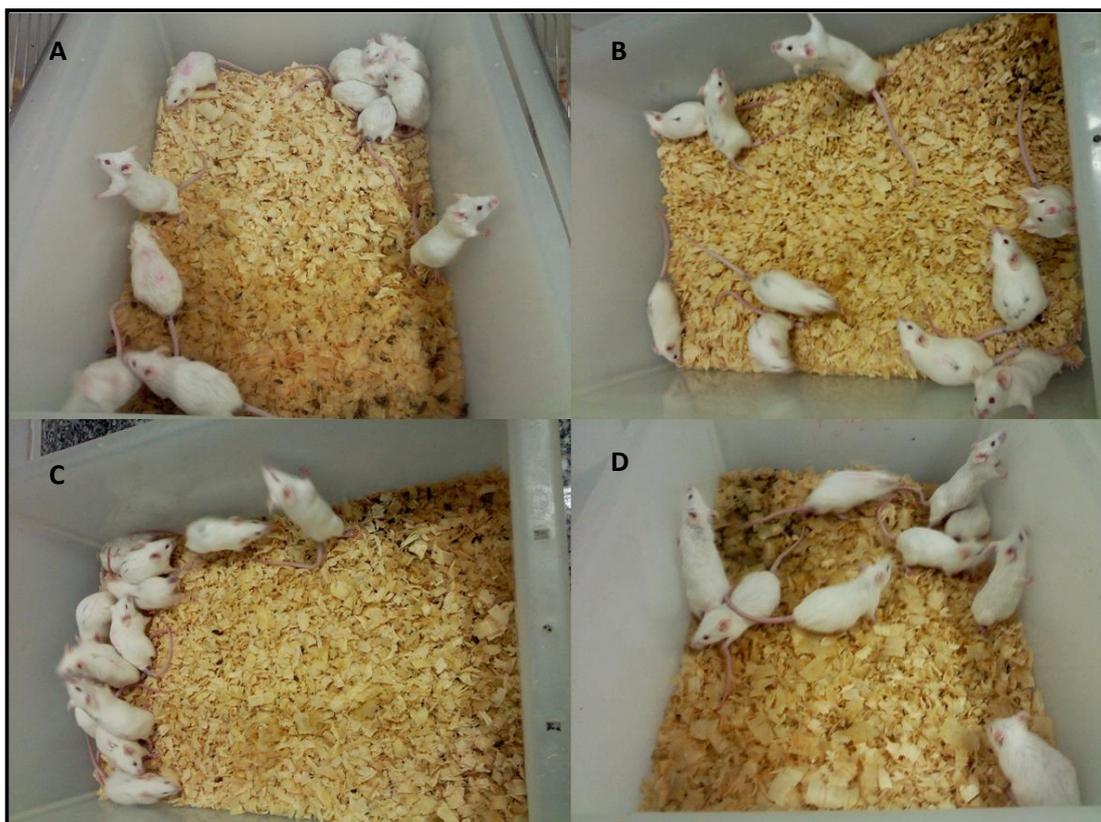


FIGURA 22 – Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a massa corpórea de camundongos diabéticos ao longo de 20 dias de tratamento. Valor expresso como média \pm desvio padrão.

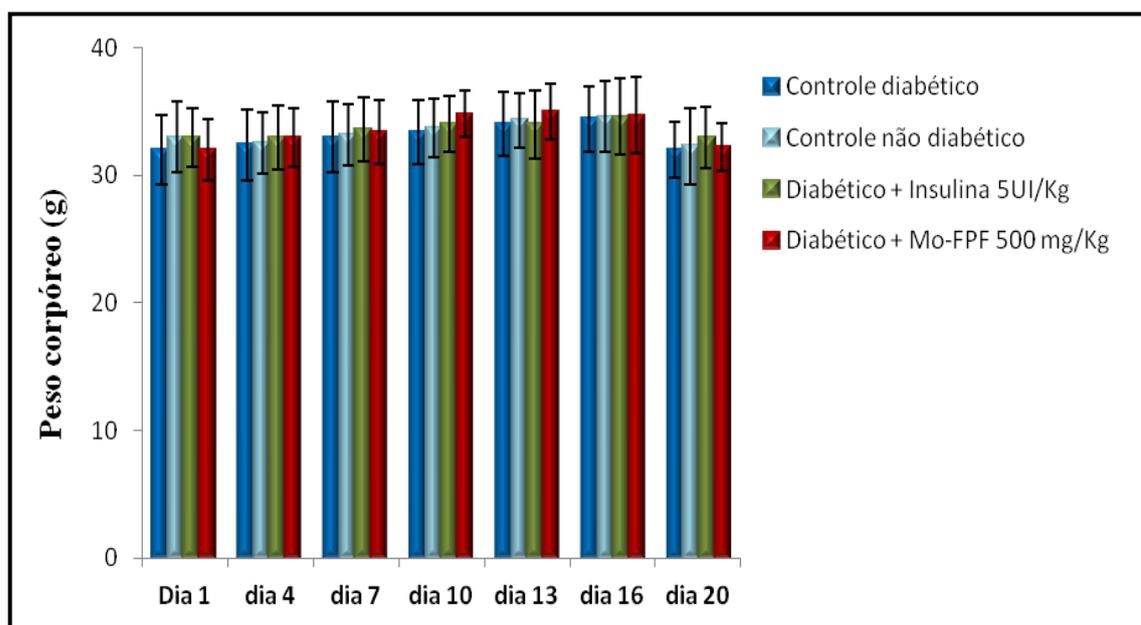


TABELA 7 – Concentrações de lipídeos e lipoproteínas séricas em camundongos (n = 12) após 20 dias de administração intraperitoneal de doses repetidas (500 mg/Kg de peso corpóreo) da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%)

	Colesterol total	HDL	LDL	VLDL	Triacilgliceróis
Controle diabético	135,1 ± 9,7	34,5 ± 9,5	56,3 ± 7,1	44,5 ± 7,3	222,6 ± 36,6
Controle não diabético	138,3 ± 16,6	34,9 ± 5,2	61,1 ± 8,8	42,3 ± 9,5	210,6 ± 38,6
Insulina 5 UI/Kg de peso corpóreo	139,5 ± 7,6	32,8 ± 5,7	59,1 ± 7,7	47,6 ± 8,7	236,8 ± 32,7
Mo-FPF 500 mg/Kg de peso corpóreo	97,8 ± 14,7 ^{***###}	36,3 ± 9,3	19,6 ± 3,5 ^{***###}	41,7 ± 9,0	208,5 ± 36,7

Valores em mg/dL de soro, expressos como média ± desvio padrão.

*** Valores que diferiram em relação ao controle diabético ($p < 0,001$).

Valores que diferiram em relação ao controle não diabético ($p < 0,001$).

TABELA 8 – Níveis séricos em camundongos (n = 12) de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina, proteínas totais e albumina após 20 dias de administração intraperitoneal de doses repetidas (500 mg/Kg de peso corpóreo) da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%)

	Controle diabético	Controle não diabético	Insulina (5 UI/Kg de peso corpóreo)	Mo-FPF (500 mg/Kg de peso corpóreo)
AST (UI)	190,30 ± 24,70 ^a	192,60 ± 26,00 ^a	175,90 ± 47,30 ^a	182,40 ± 35,10 ^a
ALT (UI)	50,20 ± 6,80 ^b	49,70 ± 7,30 ^b	46,84 ± 9,60 ^b	47,30 ± 9,00 ^b
FA (U/L)	44,20 ± 9,02 ^c	41,20 ± 3,51 ^c	39,60 ± 7,22 ^c	43,40 ± 5,16 ^c
Uréia (mg/dL)	31,20 ± 8,41 ^d	30,10 ± 4,55 ^d	35,90 ± 9,63 ^d	32,30 ± 9,32 ^d
Creatinina (mg/dL)	0,35 ± 0,05 ^e	0,30 ± 0,04 ^e	0,34 ± 0,05 ^e	0,31 ± 0,07 ^e
Proteínas totais (g/dL)	38,30 ± 4,36 ^f	35,60 ± 3,27 ^f	35,70 ± 4,41 ^f	37,10 ± 5,01 ^f
Albumina (g/dL)	29,60 ± 6,83 ^g	30,30 ± 3,23 ^g	31,30 ± 5,14 ^g	30,50 ± 4,93 ^g

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os grupos em relação a qualquer parâmetro mensurado. .

Figura 23 – Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre os níveis hepáticos de malondialdeído, uma espécie reativa ao ácido tiobarbitúrico, em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos ao final dos 20 dias de experimento. Os resultados representam μmol de malondialdeído por grama de tecido hepático, estando os valores expressos como média \pm desvio padrão. *** representa $p < 0,001$ em relação ao controle diabético e ### representa $p < 0,001$ em relação ao controle não diabético.

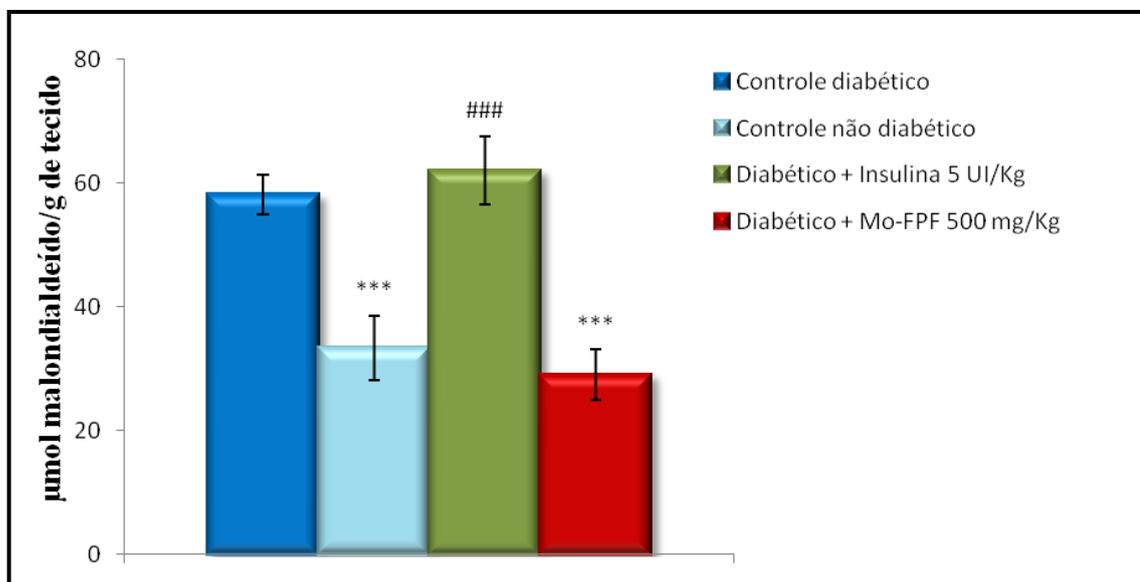


FIGURA 24 – Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, sobre a atividade de catalase hepática em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos ao final dos 20 dias de experimento. A atividade da catalase foi definida como a quantidade da enzima requerida para decompor 1 nmol de H_2O_2 por minuto, a 25 °C. Valores expressos como média \pm desvio padrão. * representa $p < 0,05$ em relação ao controle diabético e # representa $p < 0,05$ em relação ao controle não diabético.

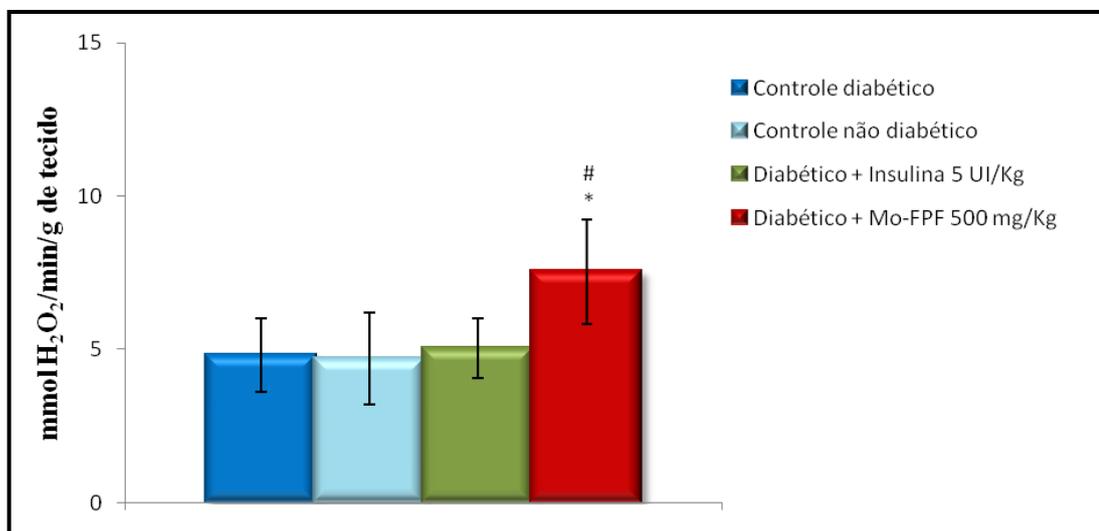


FIGURA 25 – Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, nos níveis de superóxido dismutase em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos, ao final de 20 dias de experimento. Os resultados representam unidades da enzima por micrograma de proteína, estando os valores expressos como média \pm desvio padrão. *** representa $p < 0,001$ em relação ao controle diabético e ## e ### representam $p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao controle não diabético, respectivamente.

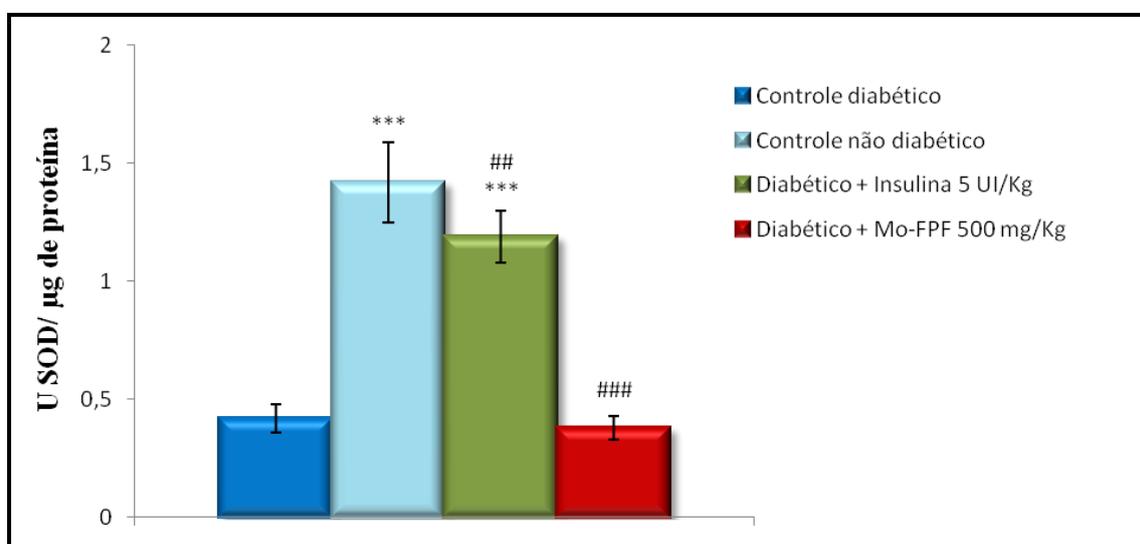
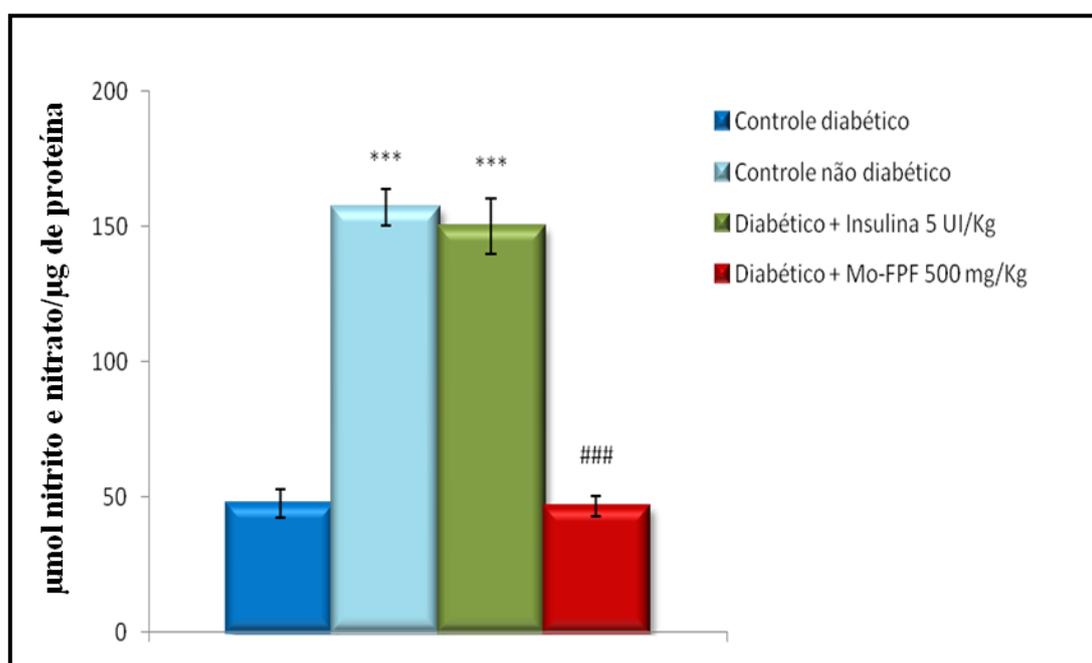


FIGURA 26 – Efeito da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, nos níveis totais de nitrito/nitrato em homogenatos de fígado de camundongos diabéticos, após os 20 dias de tratamento. Os resultados estão representados como micromoles nitrato/nitrito por micrograma de proteína, estando os valores expressos como média \pm desvio padrão. *** representa $p < 0,001$ em relação ao controle diabético e ### representa $p < 0,001$ em relação ao controle não diabético.



6.4 Toxicidade aguda

A TABELA 9 mostra os resultados referentes à verificação de sinais de toxicidade e de mortalidade após a administração intraperitoneal de *Mo*-FPF, numa dose cinco vezes maior (2500 mg/Kg de peso corpóreo) do que aquela utilizada no teste de doses repetidas. Após quatro horas da administração, foram verificados sintomas como prostração, contorções abdominais e diarreia, essa última perdurando até 24 horas. Tais sinais não mais estiveram presentes após 72 horas de administração de *Mo*-FPF. Não houve mortalidade.

TABELA 9 – Investigação de toxicidade aguda decorrente da administração intraperitoneal da fração proteica de folhas de *Moringa oleifera* (Mo-FPF), obtida por precipitação do extrato total com sulfato de amônio (0-90%), na dose de 2500 mg/Kg de peso corpóreo

Sintomas	Tempo após administração		
	4 horas	24 horas	72 horas
Alteração da locomoção	Não	Não	Não
Piloereção	Não	Não	Não
Diarréia	Sim	Sim	Não
Contorções abdominais	Sim	Não	Não
Hiperexcitabilidade	Não	Não	Não
Convulsões	Não	Não	Não
Tremores	Não	Não	Não
Alterações do equilíbrio	Não	Não	Não
Prostração	Sim	Não	Não
Morte	Não	Não	Não

7. DISCUSSÃO

Moringa oleifera, uma planta nativa do nordeste da Índia, possui grande versatilidade de utilização como alimento, agente clarificante no tratamento de água, matéria prima industrial e na medicina popular. Dentre as propriedades medicinais atribuídas a essa planta, as atividades hipocolesterolemiantes, anti-inflamatória, antireumática, antimicrobiana e os efeitos espectorantes podem ser destacados. Para as folhas, em particular, já foram relatados efeitos diuréticos, anti-inflamatórios, antiulcerogênicos e, também, hipoglicemiantes (FAHEY, 2005; GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006; ANWAR *et al.*, 2007; GOYAL *et al.*, 2007)

Destacando o potencial hipoglicemiante de *M. oleifera*, as folhas constituem os órgãos que são mais citados na literatura com respeito a essa propriedade farmacológica (NDONG *et al.*, 2007; JAISWAL *et al.*, 2009; TENDE *et al.*, 2011). Tal efeito é muito creditado a compostos resultantes do metabolismo secundário vegetal, como compostos fenólicos, terpenos e cumarinas, até mesmo pelas metodologias empregadas para obtenção dos extratos foliares, que utilizam solventes extratores específicos desses tipos de compostos ou mesmo passos metodológicos que são incompatíveis para a manutenção da estrutura e atividade de outras moléculas, como proteínas (JAISWAL *et al.*, 2009; TENDE *et al.*, 2011; NAEEM,; ALI.; MAHMOOD; 2012). De fato, a folha de *M. oleifera* é rica em metabólitos secundários, incluindo diversos tipos de polifenóis, os quais são compostos que, conhecidamente, apresentam propriedades hipoglicêmicas (LAMBA *et al.*, 2000; FRANCIS *et al.*, 2004).

Embora diversos tipos de metabólitos secundários de plantas tenham demonstrado efeitos hipoglicemiantes, pouco se tem especulado acerca de outras moléculas com tal atividade, principalmente em relação às proteínas vegetais. Entretanto, já existem evidências de que algumas proteínas de plantas atuam como hipoglicemiantes. Nesse sentido, as folhas de *M. oleifera* foram o objeto de estudo desse trabalho, que teve como objetivo principal investigar a possibilidade de participação de proteínas foliares em eventos hipoglicemiantes *in vivo*, sendo essa escolha motivada pelo fato da ação hipoglicemiante de folhas de moringa já estar bem documentada e pelo seu teor proteico ser relativamente elevado (MOURA *et al.*, 2009).

Para se chegar ao objetivo principal desse trabalho, foram desenvolvidas metodologias e realizados experimentos que (1) favorecessem ao máximo a obtenção de proteínas e a eliminação de metabólitos secundários e (2) permitissem especular a

possibilidade de efeito hipoglicemiante. Uma vez que, desses passos iniciais, foram obtidos resultados promissores, se procederam experimentos *in vivo* para investigação da existência ou não da participação proteica nos eventos hipoglicemiantes proporcionados pelas folhas de *M. oleifera*.

Os passos metodológicos empregados para concentrar as proteínas foliares extraídas resultaram na obtenção de uma fração proteica, denominada *Mo*-FPF (**F**ração **P**roteica de **F**olhas de *Moringa oleifera*), representando 4,96 mgP/g de folha (TABELA 5). *Mo*-FPF apresentou teor proteico médio de 70,8%. Considerando que os teores proteicos das folhas de *M. oleifera*, relatados na literatura, variam de 6,4 a 6,7%, o método de obtenção de *Mo*-FPF empregado nesse trabalho foi bastante eficiente em concentrar o material proteico extraído das folhas (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; MOURA *et al.*, 2009).

A coloração verde de *Mo*-FPF e a sua viscosidade quando em solução sugeriam que pigmentos poderiam ter sido carregados com as proteínas e a elas mantidos associados, uma vez que as principais proteínas foliares são cloroplásticas e, também, apontavam para a presença de carboidratos de elevada massa molecular, respectivamente (GUERROUÉ *et al.*, 1996). Na tentativa de amenizar as características ressaltadas, *Mo*-FPF foi dialisado. No entanto, foi utilizada uma membrana com *cut-off* de 2 kDa, com intuito de preservar, inclusive, os peptídeos pequenos no material dialisado. O fato de ter sido usada uma membrana de tamanho de poro pequeno pode ter favorecido a permanência não somente de carboidratos, mas, também, de metabólitos secundários de massas moleculares elevadas (WINK, 2010).

A avaliação do perfil eletroforético de *Mo*-FPF mostrou uma diversidade de proteínas, em sua maioria com massas moleculares acima de 29 kDa (FIGURA 7). Uma banda proteica com massa molecular aparente de 19,0 kDa também foi observada, sendo essa massa próxima àquelas já observadas para proteínas hipoglicemiantes (KHANNA; JAIN, 1981; RAJASEKHAR *et al.*, 2010). O perfil eletroforético de proteínas de folhas de *Bauhinia variegata*, das quais foi isolado um peptídeo do tipo insulina, também mostrou uma grande versatilidade de bandas proteicas (AZEVEDO *et al.*, 2006).

Outra propriedade de *Mo*-FPF foi a susceptibilidade *in vitro* à ação de proteases digestivas comumente encontradas em mamíferos monogástricos, tais como pepsina e tripsina (FIGURAS 8 e 9). Esse dado reforça a natureza proteica de *Mo*-FPF, tendo sido verificado que concentrados proteicos de outras plantas também apresentaram elevada digestibilidade frente às proteases (MODESTI *et al.*, 2007).

Diversas plantas com compostos apresentando atividade antioxidante *in vitro* também exerceram atividade hipoglicemiante em modelos animais de diabetes (MANOSROI *et al.*, 2011; KUNYANGA *et al.*, 2012). A atividade de remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ter benefícios em relação ao controle glicêmico, uma vez que essas moléculas participam da fisiopatologia do diabetes e da resistência insulínica (TIGANIS, 2011). As peroxidases de fenóis estão envolvidas em aspectos importantes da fisiologia das plantas, dentre eles a regulação do crescimento e do processo de formação da parede celular. Sua atividade antioxidante se dá pela remoção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) através de sua redução a uma molécula de água, utilizando como mediador redox um composto fenólico, como o guaiacol (OLIVEIRA; GONDIM; VASCONCELOS, 2009). *In vitro*, Mo-FPF apresentou considerável atividade de peroxidase dependente de guaiacol (FIGURA 10), uma peroxidase de fenóis, mas não de peroxidase dependente de ascorbato e nem atividade catalásica (FIGURAS 11 e 12). *Mormodica charantia*, uma planta bem documentada com relação a seus efeitos hipoglicemiantes também mostrou uma elevada atividade peroxidásica mediada por guaiacol (KARIM; HUSAIN, 2010).

Mo-FPF apresentou atividade hemaglutinante ou lectínica em eritrócitos (tripsinizados ou não) de ratos e de camundongos sem a dependência de cátions divalentes (TABELA 6). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que possuem, no mínimo, um domínio não catalítico e se ligam reversivelmente a carboidratos, possuindo um ou mais sítios de ligação, podendo ser caracterizadas e detectadas por sua capacidade de aglutinar eritrócitos, em certos casos com alta especificidade (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LIS; SHARON, 1998). Lectina de sementes de *Urtica pilulifera* exerceu atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes induzidos por estreptozotocina (KAVALALI *et al.*, 2003). Algumas lectinas possuem a capacidade de se ligar a receptores de insulina e de induzir cascatas de reações elicítadas por esse hormônio (SMITH; LIU, 1981; SUZUKI *et al.*, 1984). A presença de atividade lectínica verificada para Mo-FPF pode sugerir um efeito hipoglicemiante *in vivo* ou atividade do tipo insulina *in vitro* para essa fração proteica.

Por meio do ensaio imunológico de *dot blot*, o anticorpo anti-insulina humana reconheceu Mo-FPF, sugerindo a presença de epítomos antigênicos do tipo insulina em sua estrutura (FIGURA 13). Azevedo *et al.* (2006) isolaram uma proteína do tipo insulina de folhas de *Bauhinia variegata*, que foi reconhecida por anticorpo anti-insulina humana e apresentou atividade hipoglicemiante em camundongos com diabetes induzido por aloxano, após administração subcutânea. Uma proteína do tegumento de sementes de *Canavalia ensiformis* também reagiu com anticorpo anti-insulina e demonstrou atividade

hipoglicemiante em camundongos com diabetes aloxânico (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Antígenos do tipo insulina em espinafre apresentaram ligação a receptores de insulina e elicitaram respostas insulínicas em células adiposas (COLLIER *et al.*, 1987). Com esses dados, há forte indício em relação a *Mo*-FPF de ser um potencial hipoglicemiante.

A próxima etapa do trabalho foi a avaliação do efeito hipoglicemiante da *Mo*-FPF em camundongos com diabetes induzido por aloxano. Aloxano, uma pirimidina com estrutura semelhante à glucose, é um agente diabetogênico efetivo, que destrói células beta pancreáticas através da geração de espécies reativas ao oxigênio no interior dessas células (WALDE *et al.*, 2002). No presente estudo, com a dose de aloxano de 150 mg/Kg de massa corpórea, a porcentagem de diabetização nos animais, ou seja, de animais com glicemias acima de 250 mg/dL, foi de $75 \pm 10\%$ (dados não mostrados). Uma vez que o estresse acaba por estimular a liberação de hormônios contra-reguladores (catecolaminas, cortisol, glucagon) envolvidos no aumento da glicemia, com o fim de disponibilizar uma fonte energética a ser rapidamente utilizada pelo animal em uma situação de alerta, um período de adaptação de 10-12 dias foi previamente incluído (SQUIRES, 2003). A adaptação consistiu de simulações das manipulações que ocorreriam no dia dos experimentos, a fim de minimizar a interferência do estresse nas glicemias, decorrente da manipulação animal. Ao longo do período de adaptação, foi percebida a redução do número de defecações e do estado de agitação dos animais, no momento das manipulações, o que poderia configurar um estado de menor liberação de hormônios hiperglicemiantes envolvidos na resposta adaptativa ao estresse.

Nos camundongos diabéticos, a administração intraperitoneal de *Mo*-FPF, nas doses de 300 e 500 mg/Kg de peso corpóreo, resultou em glicemias significativamente menores do que as do controle diabético, tratado intraperitonealmente com o veículo (tampão Tris-HCl 0,025 M com NaCl 0,15 M, pH 7,5), e essa diferença foi observada já no período de 1 hora após a administração, tornando-se mais evidente após 3 e 5 horas (FIGURA 14). A dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo de *Mo*-FPF foi a que se mostrou mais eficiente em termos de atividade hipoglicemiante, promovendo, em relação às glicemias mensuradas antes do tratamento ($t = 0$ horas), reduções de 10, 53 e 60%, em comparação com os decréscimos de 3, 36 e 38% verificados para a dose de 300 mg/Kg de peso corpóreo, nos tempos de 1, 3 e 5 horas, respectivamente (FIGURA 15). Em 1 hora após o tratamento com insulina, foi verificada uma redução glicêmica de 53% em relação à glicemia anterior ao tratamento, configurando uma queda rápida e brusca da glicemia. Nesse grupo, hipoglicemias podem ter ocorrido, de forma que nos tempos de 3 e 5 horas as glicemias não foram ainda menores, possivelmente porque ocorreu a liberação de hormônios contra-reguladores, liberados para

corrigir a queda acentuada da glicemia. Eventos hipoglicêmicos constituem um efeito colateral bastante comum em indivíduos que fazem uso da terapia insulínica para o controle do diabetes (CRYER; DAVIS; SHAMOON, 2003). Contrariamente, *Mo*-FPF, na dose mais efetiva, produziu reduções glicêmicas lentas e graduais. A proteína hipoglicêmica de *Mormodica cymbalaria*, administrada intraperitonealmente, na dose de 2,5 mg/Kg, também foi hábil em reduzir de forma aguda a glicemia de ratos diabéticos, promovendo uma redução de 64,5% após 5 horas de sua administração (RAJASEKHAR *et al.*, 2010). A administração subcutânea de uma dose única do extrato proteico de frutos de *Mormodica charantia* exerceu efeitos hipoglicemiantes em 4 horas (YIBCHOK-ANUN *et al.*, 2006). Também, através de testes de dose única, extratos de outras plantas exerceram efeito hipoglicemiante quando administrados intraperitonealmente e, em alguns casos, com a utilização da rota intragástrica (ALMEIDA *et al.*, 2006; TANKO *et al.*, 2008; EIDI *et al.*, 2010).

Contrariamente ao observado pela via intraperitoneal, a administração intragástrica de *Mo*-FPF, na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo, não exerceu efeito hipoglicemiante em camundongos diabéticos (FIGURA 16). As glicemias verificadas 1, 3 e 5 horas após a administração dessa fração foram semelhantes àquelas observadas no controle diabético. Tomando-se por base os resultados de digestibilidade *in vitro*, nos quais *Mo*-FPF foi totalmente digerida por pepsina e tripsina, é sugerida a natureza proteica do princípio hipoglicemiante de *Mo*-FPF. É possível que, *in vivo*, *Mo*-FPF tenha sido digerida ao longo do trato digestório, o que ocasionou a inativação desse princípio. Uma fração proteica do extrato aquoso de frutos de *M. cymbalaria*, obtida a partir da precipitação com sulfato de amônio, produziu reduções significativas nos níveis glicêmicos de jejum, quando administrada intravenosamente em ratos diabéticos. Uma proteína purificada a partir dessa fração proteica, denominada M. Cy, quando administrada por via parenteral, promoveu glicemias significativamente menores do que as do controle diabético, tratado com o veículo, enquanto que pela via de administração oral, essa proteína não foi capaz de exercer efeito hipoglicemiante (RAJASEKHAR *et al.*, 2010).

O aquecimento prévio de *Mo*-FPF a 100 °C, por 1 hora, resultou na perda da atividade hipoglicemiante observada em 1 e 3 horas, após a sua administração intraperitoneal (500 mg/Kg de peso corpóreo) (FIGURA 17). Contudo, 5 horas após a administração da fração proteica fervida, a glicemia foi significativamente menor do que a observada no controle diabético. Essa diminuição na atividade hipoglicemiante pode ter sido ocasionada pela desnaturação parcial do material proteico, requerendo um maior tempo para ser observada. Estudos espectroscópicos e de escaneamento calorimétrico mostraram que entre 60

e 70 °C existe uma perda considerável da estrutura secundária da lectina de *M. charantia*, comprometendo sua atividade hipoglicemiante (KAVITHA; BOBBILI; SWAMY, 2010).

O tratamento crônico com *Mo*-FPF, durante 20 dias, resultou em níveis de glicose sanguínea significativamente menores do que os do controle diabético, em todos os dias nos quais as glicemias foram mensuradas (FIGURA 18). As reduções glicêmicas mais consistentes foram verificadas no 4º e 20º dia de tratamento, as quais corresponderam a reduções de 50 e 57%, respectivamente, em relação à média glicêmica observada antes do tratamento (FIGURA 19). Contrariamente, as médias glicêmicas do controle diabético no 4º dia de tratamento em diante foram maiores do que a média verificada antes do início do tratamento com o veículo, com hiperglicemias severas e consistentes, configurando uma piora no quadro clínico dos animais. Hiperglicemias prolongadas e constantes constituem a principal causa de complicações crônicas em indivíduos diabéticos. Por outro lado, melhoras no controle glicêmico resultam na prevenção ou retardo do aparecimento dessas complicações e de outras alterações associadas ao diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). A atividade hipoglicemiante de *Mo*-FPF resultou em um bom controle dos níveis de glicose sanguínea ao longo dos 20 dias de tratamento, a ponto de promover no 4º, 16º e 20º dia, glicemias semelhantes àsquelas observadas no grupo controle não diabético. Em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, a lectina de sementes de *Urtica pilulifera* causou efeito hipoglicemiante significativo após 30 dias de administração intraperitoneal diária. Doses diárias de uma xantona isolada de folhas de *Mangifera indica*, administradas pela via intraperitoneal, durante 28 dias, promoveram percentuais de reduções glicêmicas similares àsquelas verificadas para *Mo*-FPF em camundongos com diabetes aloxânico (KAVALALI *et al.*, 2003; MURUGANANDAN *et al.*, 2005). Saponinas de *Panax notoginseng* e extrato de *Gymnema yunnanense* também reduziram de forma significativa as glicemias de camundongos com diabetes tipo 2 espontâneo, quando da administração intraperitoneal diária por 28 e 12 dias, respectivamente (XIE *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2010).

De forma similar ao efeito hipoglicemiante produzido pela administração intraperitoneal de *Mo*-FPF, o tratamento diário pela rota intragástrica do extrato aquoso das folhas de moringa também reduziu as glicemias em modelos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (JAISWAL *et al.*, 2009). Nesse estudo de tratamento crônico, que durou 21 dias, a máxima redução glicêmica foi de 69,2%, verificada no último dia de tratamento. A maior porcentagem de redução glicêmica promovida pela *Mo*-FPF nos camundongos diabéticos, como discutido anteriormente, foi de 57%, também verificada no último dia do experimento de tratamento crônico, que durou 20 dias.

Os dados das glicemias mensuradas ao longo do teste de dose crônica corroboram com os resultados referentes à polidipsia decorrente do estado hiperglicêmico (FIGURA 20). A ingestão média de água no grupo de animais não diabéticos variou de 20 a 33 mL/100 g de massa corpórea, enquanto que no controle diabético, que apresentou hiperglicemias consistentes e severas ao longo de todo o estudo, foi verificada uma intensa polidipsia, com volumes médios de ingestão de água acima de 140 mL/100 g de massa corpórea, em todos os dias de mensuração. Os tratamentos com insulina e *Mo*-FPF resultaram em ingestões médias de água bem menores do que as verificadas no controle diabético (34-51 e 39-63 mL/100 g de massa corpórea, respectivamente), uma vez que preveniram as severas hiperglicemias verificadas nesses grupos. A relação entre melhor controle glicêmico e amenização de polidipsia também foi verificada em dois estudos onde extrato metanólico de folhas de *Ichnocarpus frutescence* e extrato aquoso de flores de *Inula japonica*, ambos hipoglicemiantes, foram administrados em camundongos e em ratos diabéticos, respectivamente (SHAN; YANG; REN, 2006; SUBASH-BABU; IGNACIMUTHU; AGASTIAN, 2008).

Da mesma forma que observada a polidipsia, uma intensa poliúria foi verificada no controle diabético, enquanto que, aparentemente, uma taxa de micção bem menor ocorreu no controle normal e nos grupos diabéticos tratados com insulina e *Mo*-FPF (FIGURA 21). Em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, extratos hipoglicemiantes de *M. charantia*, *Eugenia jambolana*, *Mucuna pruriens* e *Tinospora cordifolia* evitaram a ocorrência de intensa poliúria verificada no controle diabético não tratado (GROVER *et al.*, 2001). Adicionalmente, já foi relatada amenização da perda de peso por conta do estado de privação de insulina em modelos de animais diabéticos após o tratamento crônico com extratos vegetais (PARI; SATHEESH, 2004; RAMACHANDRAN; RAJASEKARAN; MANISENTHILKUMAR, 2012). No presente trabalho, não houve diferença estatística entre os quatro grupos experimentais em relação à massa corpórea (FIGURA 22). A ausência de perda de peso no controle diabético sugere que o tempo de 20 dias não foi suficiente para o aparecimento desse sintoma.

Alguns extratos vegetais exercem seu efeito hipoglicemiante em animais com diabetes induzido através de um efeito secretagogo de insulina, verificado pelo aumento dos níveis séricos desse hormônio, sugerindo que tal estímulo de secreção é promovido em células beta pancreáticas residuais que não foram destruídas pelo agente diabetogênico utilizado (KAVALALI *et al.*, 2003; AL-KHATEEB *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2011; GANDHI; IGNACIMUTHU; PAULRAJ, 2012; NAIN *et al.*, 2012). No presente estudo, a administração

intragástrica de glibenclamida (um antidiabético oral que atua como secretagogo de insulina) em camundongos diabéticos exerceu efeito hipoglicemiante (FIGURA 16), sugerindo que no modelo experimental de diabetes aloxânico, utilizado no presente trabalho, existiam células beta pancreáticas remanescentes. Assim, especulações futuras poderiam ser realizadas para verificar se *Mo*-FPF também atuaria como um estimulador da secreção insulínica.

Ainda com relação ao mecanismo de ação de extratos e compostos hipoglicemiantes de plantas, também tem sido relatado que tal efeito pode ser devido a ações insulínomiméticas. O extrato proteico de frutos de *M. charantia* exerceu efeito hipoglicemiante em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina e, também, promoveu aumento significativo da captação de glucose por culturas de células adiposas e musculares, de modo semelhante ao estímulo insulínico (YIBCHOK-ANUN *et al.*, 2006). Tem sido proposto que proteínas hipoglicemiantes reconhecidas por anticorpo anti-insulina exercem tal efeito ao ligar-se a receptores de insulina presentes na membrana celular (OLIVEIRA *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2002; VENANCIO *et al.*, 2003; AZEVEDO *et al.*, 2006). De fato, antígenos vegetais reconhecidos por anticorpo anti-insulina e que estimularam a captação *in vitro* de glucose por células isoladas de adipócitos foram hábeis em se ligar a receptores de insulina presentes em culturas de linfócitos IM-9. A congulinina- δ , uma glicoproteína de sementes de lupina que apresentou efeitos hipoglicemiantes em ratos, aumentou o transporte de glucose, a translocação de receptores GLUT-4 e a transcrição gênica músculo-específica através das mesmas vias de sinalização estimuladas após a ligação da insulina ao seu receptor (COLLIER *et al.*, 1987; TERRUZZI *et al.*, 2011). *Mo*-FPF promoveu um efeito hipoglicemiante considerável em camundongos diabéticos e, também, foi reconhecida por anticorpos anti-insulina humana (FIGURA 10). Além disso, *Mo*-FPF apresentou atividade hemaglutinante em hemácias de camundongos (TABELA 4), havendo relatos de que muitas lectinas foram capazes de interagir com receptores de insulina e de exercer atividades insulínomiméticas em culturas de células (CZECH; LYNN, 1973; HEDO; HARRISON; ROTH, 1981; SMITH; LIU, 1981; SUZUKI *et al.*, 1984; NG *et al.*, 1985; NG; LI; YEUNG, 1989). Uma lectina ligante a galactose, isolada de *M. charantia* exerceu atividade antilipolítica e lipogênica em adipócitos de forma semelhante à insulina (NG *et al.*, 1986). Experimentos adicionais são necessários para elucidar a possibilidade da existência de alguma molécula proteica em *Mo*-FPF capaz de elicitar ações insulínomiméticas através da ligação a receptores de insulina e, em caso positivo, se tal molécula pertence à classe das lectinas.

Em geral, indivíduos diabéticos possuem um risco de doenças cardiovasculares 2 a 4 vezes maior em relação à população não diabética, em virtude de anormalidades nas

concentrações de lipídeos e de lipoproteínas séricas decorrentes do estado hiperglicêmico prolongado, sendo a doença macrovascular responsável por 80% da mortalidade em pessoas com diabetes (VILJOEN; WIERZBICKI, 2010). A dislipidemia no diabetes é caracterizada por elevações séricas dos triacilgliceróis, da fração LDL colesterol e por reduções dos níveis de HDL colesterol (TASKINEN, 2002). Já foi relatado o aparecimento dessas anormalidades em modelos de animais com diabetes quimicamente induzido e a melhora de tais parâmetros após o tratamento com extratos ou substâncias hipoglicemiantes isoladas de espécies vegetais (MURUGANANDAN *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2011; RAMACHANDRAN; RAJASEKARAN; MANISENTHILKUMAR, 2012). No presente estudo, não houve diferença estatística entre os níveis de colesterol total e frações e de triglicérides entre os grupos controle diabético e não diabético ao final do teste de doses repetidas, sugerindo que o tempo de duração do teste não foi suficiente para o aparecimento de anormalidades lipídicas decorrentes da hiperglicemia crônica (TABELA 7). Ainda assim, o tratamento com *Mo*-FPF resultou em níveis séricos de colesterol total e LDL significativamente menores do que ambos os controles, sem alterar os níveis de HDL e triacilgliceróis. Esse efeito hipocolesterolêmico parece resultar de um efeito direto da *Mo*-FPF, ao invés de ser decorrente do efeito hipoglicemiante, já que os níveis séricos entre os controles diabético e não diabético foram similares. LDL é considerado o alvo primário para redução no tratamento hipolipemiante de indivíduos diabéticos, uma vez que se constitui como o fator de risco mais importante para doença arterial coronariana nessa população (TURNER *et al.*, 1998). Reduções nos níveis de LDL com estatinas, uma classe de fármacos hipocolesterolêmicos que inibem a enzima limitante da biossíntese do colesterol, são associadas com concomitantes decréscimos, acima de 30%, em eventos cardiovasculares. Os benefícios de efeitos hipocolesterolêmicos em pacientes diabéticos é maior que em indivíduos não diabéticos, uma vez que pacientes com diabetes apresentam um maior risco de eventos ateroscleróticos (SACKS *et al.*, 2000; HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP, 2002; COLHOUN *et al.*, 2004; KNOPP *et al.*, 2006; CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) COLLABORATORS, 2008). Estudos posteriores são necessários para esclarecer o mecanismo hipocolesterolemiante da *Mo*-FPF.

A avaliação de parâmetros séricos adicionais mostrou que os níveis de AST, ALT e fosfatase alcalina não foram alterados pela hiperglicemia crônica (TABELA 8). O tratamento com *Mo*-FPF manteve os níveis desses marcadores de injúria hepática, indicando que essa fração proteica não exerceu efeito tóxico no fígado. Da mesma forma, os níveis de ureia e creatinina não foram diferentes entre os grupos. A prevenção de aumentos significativos dos

níveis de ureia e creatinina em modelos de animais diabéticos após a administração de extratos hipoglicemiantes de plantas já foi verificada. Porém, o tempo de duração do teste de doses repetidas empregado nesse trabalho parece ter sido insuficiente para promover o aparecimento de danos renais, de modo a permitir a prospecção de algum efeito protetor de *Mo*-FPF (GROVER *et al.*, 2001; AL-ATTAR; ZARI, 2010; XUE *et al.*, 2011). Similarmente, não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis séricos de proteína total e albumina.

O aumento da produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*), configurando o estresse oxidativo, constitui um elemento importante na fisiopatologia do diabetes. Essas espécies, tais como radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e ânions superóxido, são produzidas em excesso pela mitocôndria, como resultado de um aumento na atividade da cadeia transportadora de elétrons induzido pela hiperglicemia intracelular (GIACCO; BROWNLEE, 2010). O aumento de ROS ocasiona danos a diversas estruturas celulares, incluindo proteínas, DNA e lipídios de membrana, disparando o curso do desenvolvimento de complicações diabéticas bem como piorando o controle glicêmico (NISHIKAWA *et al.*, 2000; NEWSHOLME *et al.*, 2007). Subprodutos da peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA), se elevam com o aumento de ROS, funcionando como marcadores de estresse oxidativo (RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). A FIGURA 23 mostra o aumento da peroxidação lipídica no controle diabético em relação ao controle não diabético decorrente, provavelmente, da hiperglicemia crônica e, também, da administração de aloxano. O tratamento dos camundongos diabéticos com *Mo*-FPF reduziu as concentrações de MDA a níveis próximos do controle não diabético. Contrariamente, o tratamento com insulina não foi capaz de reduzir os níveis de MDA. Isso pode ter acontecido, em parte, pela ocorrência de hiperglicemias transitórias pós-prandiais, que podem ter sido mais prolongadas no grupo tratado com insulina do que nos animais tratados com *Mo*-FPF. Hiperglicemias persistentes podem induzir um aumento de ROS mesmo após a normalização nos níveis glicêmicos, fenômeno conhecido por memória hiperglicêmica (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Além disso, *Mo*-FPF pode também ter atuado como varredora de ROS geradas pelo aloxano, enquanto que a insulina não exerceu tal efeito (AHLEM *et al.*, 2009).

Os níveis de SOD sofreram reduções significativas no controle diabético, bem como nos grupos diabéticos tratados com *Mo*-FPF e com insulina, em relação ao controle não diabético (FIGURA 25). A insulina amenizou essa redução, uma vez que esse hormônio estimula a atividade de SOD (LIMA *et al.*, 2011). Já para a catalase, não houve diferença nos

níveis dessa enzima em relação aos controles e ao grupo diabético tratado com insulina (FIGURA 24). No entanto, os níveis de catalase foram significativamente maiores no grupo tratado com *Mo*-FPF em relação ao controle não-diabético. Esse resultado também pode explicar a normalização dos níveis de MDA promovido por *Mo*-FPF, pois ocorreu o aumento de catalase acima dos níveis basais de normalidade, acompanhando o aumento de ROS decorrente da situação diabética. Em relação ao grupo tratado com insulina, os níveis de enzimas antioxidantes não foram aumentados acima dos níveis basais, o que provavelmente fez com que o tratamento com insulina não promovesse a redução dos níveis de MDA. Extratos hipoglicemiantes de *Terminalia paniculata*, *Tectona grandis* e *Potentilla discolor* também foram capazes de reverter as alterações nos níveis de enzimas antioxidantes verificadas no controle diabético e de normalizar ou amenizar a peroxidação lipídica em animais com diabetes quimicamente induzido (ZHANG *et al.*, 2010; RAMACHANDRAN; RAJASEKARAN; KUMAR, 2011; RAMACHANDRAN; RAJASEKARAN; MANISENTHILKUMAR, 2012).

Os níveis de óxido nítrico foram reduzidos no grupo controle diabético em relação ao controle não diabético e apenas o tratamento com insulina foi capaz de evitar essa redução nos animais diabéticos, resultando em níveis de NO semelhantes aos do controle não diabético (FIGURA 26). É sabido que o diabetes é uma condição que reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico, um potente vasodilatador, sendo tal redução uma das principais causas da disfunção endotelial presente nessa doença (KEARNEY *et al.*, 2007). Insulina é um estimulador da produção de NO (CARVALHO; COLAÇO; FORTE, 2006) e sua ausência no grupo controle diabético e diabético tratado com *Mo*-FPF pode ter contribuído para a redução significativa dos níveis dessa molécula. Já a administração de insulina exógena evitou esse abaixamento nos camundongos diabéticos. O NO, apesar de ter papéis benéficos no que diz respeito à homeostase vascular e a outros processos fisiológicos, pode se tornar tóxico em condições de estresse oxidativo, uma vez que pode reagir com ROS produzindo o radical peroxinitrito (ONOO^-), deletério para a célula (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). A elevada peroxidação lipídica verificada nos animais diabéticos tratados com insulina também pode ser explicada pelo aumento da produção de ONOO^- , uma vez que nesse grupo os níveis de NO não foram reduzidos na condição de estresse oxidativo.

Com relação à toxicidade aguda, a administração intraperitoneal de *Mo*-FPF na dose de 2500 mg/Kg de peso corpóreo não promoveu mortalidade dos camundongos no período de 24 horas. Ao estender o período de observação até 72 horas, também não ocorreu morte. Awodele *et al.* (2012) encontraram taxas de mortalidade de 20 e 80% nas doses de 1000 e

2000 mg/Kg de peso corpóreo, respectivamente, após a administração intraperitoneal em ratos do extrato aquoso de folhas de moringa, com uma DL_{50} de 1585 mg/Kg de peso corpóreo. *Mo*-FPF também foi obtida a partir de um extrato aquoso. Todavia, é possível que as etapas empregadas na obtenção da fração proteica tenham contribuído para a perda de componentes tóxicos que, possivelmente, estivessem presentes no extrato total. Em ratos, a administração intragástrica do extrato aquoso de folhas de moringa, nas doses de 1000 e 2000 mg/Kg de peso corpóreo também não apresentou mortalidade durante o período de 24 horas (JAISWAL *et al.*, 2009).

Em relação à presença de sinais de toxicidade, *Mo*-FPF, nas primeiras 4 horas após a administração intraperitoneal, promoveu apatia nos animais, após o que se tornaram novamente ativos (TABELA 9). Adedapo, Mogbojuri e Emikpe (2009) relataram apatia nas primeiras 5 horas após administração intragástrica do extrato aquoso das folhas de moringa. Awodele *et al.* (2012) também observaram esse sintoma nas duas primeiras horas que procederam a administração intragástrica e intraperitoneal do extrato de folhas de moringa, tendo sido logo após revertido. Disso, surge a ideia de que algum composto presente no extrato total aquoso de moringa, com possibilidade de atuar como depressor do sistema nervoso central, pode também estar presente em *Mo*-FPF. Em relação aos outros sintomas observados, compreendendo diarreia e contorções abdominais, este último insinuando dor, é possível que sejam provenientes da sobrecarga hepática ocasionada pela elevada quantidade

de proteínas administradas e da elevada viscosidade da solução concentrada de *Mo*-FPF, respectivamente.

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi obtida uma fração proteica de folhas de *Moringa oleifera*, denominada *Mo*-FPF, que apresenta atividades peroxidásica e hemaglutinante e é reconhecida pelo anticorpo policlonal anti-insulina humana. A administração intraperitoneal da *Mo*-FPF em camundongos com diabetes quimicamente induzido resultou em efeitos hipoglicemiantes, hipocolesterolemiantes e antioxidantes, não tendo sido observada letalidade, mesmo quando utilizada em dose mais elevada. Tal efeito hipoglicemiante se mostrou reduzido quando *Mo*-FPF foi previamente fervida por 1 hora e ausente pela via de administração oral. Em suma, os dados obtidos mostram que moléculas de natureza proteica presentes em folhas de *M. oleifera* contribuem para o efeito hipoglicemiante observado com essa espécie vegetal e revelam o potencial de *Mo*-FPF para utilização no tratamento do diabetes.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, P.; BONIFACIO, E.; KOCZWARA, K.; ZIEGLER, A-G. Natural history of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. S25-S31, 2005. Suplemento 2.
- ADEDAPO, A.A.; MOGBOJURI, O.M.; EMIKPE, B.O. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, p. 586-591, 2009.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGAR, E.; BOSNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMIR, S.; AYYILDIZ, CELIK, C.; The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport**, v. 10, p. 1799-1801, 1999.
- AHLEM, S.; KHALED, H.; WAFI, M.; SOFIANE, B.; MOHAMED, D.; JEAN-CLAUDE, M.; ABDELFATTAH, F. Oral administration of *Eucalyptus globulus* extract reduces the alloxan-induced oxidative stress in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 181, p. 71-76, 2009.
- AIELLO, L.M.; AIELLO, L.P.; CAVALLERANO, J.D. Ocular complications of diabetes mellitus. *In*: KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J.; JACOBSON, A.M. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Boston: Joslin Diabetes Center, 2005. p. 823-837.
- AL-ATTAR, A.M.; ZARI, T.A. Influences of crude extract of tea leaves, *Camellia sinensis*, on streptozotocin diabetic male albino mice. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 295-301, 2010.
- AL-AWWADI, N.; AZAY, J.; POUCHERET, P.; CASSANAS, G.; KROSNIAK, M.; AUGER, C.; GASC, F.; ROUANET, J-M.; CROS, G.; TEISSEDRE, P.L. Antidiabetic activity of red wine polyphenolic extract, ethanol or both in streptozotocin-treated rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1008-1016, 2004.
- AL-AZZAWIE, H.F.; ALHAMDANI, M-S.S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. **Life Sciences**, v. 78, p. 1371-1377, 2006.
- AL-KHATEEB, M.; DALLAK, M.; AL-HASHEM, F.; BASHIR, N.; ABBAS, M.; ELESSA, R.; KHALIL, M. *In vivo*, acute, normo-hypoglycemic, antihyperglycemic, insulinotropic actions of orally administered ethanol extract of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrab Pulp. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 5, p. 118-125, 2009.
- ALI, 2009. Type 1 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations. *In*: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 181-201.
- ALLALI, L.; BENMEHDI, H.; DIB, M.A.; TABTI, B.; GHALEM, S.; BENABADJI, N. Phytotherapy of diabetes in West Algeria. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, p. 2701-2710, 2008.

ALMEIDA, E.R.; GUEDES, M.C.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; XAVIER, H. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 276-278, 2006.

ALSAHLI, M.; GERICH, J.E. Abnormalities of insulin secretion and β -cell defects in type 2 diabetes. In: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 160-173.

AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS. Medical guidelines for clinical practice for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan. **Endocrine Practice**, v. 17, p. 1-53., 2011. Suplemento 2.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, p. S64-S71, 2012. Suplemento 1.

_____. Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S. in 2002. **Diabetes care**, v. 31, p. 596-615, 2007.

_____. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. S15-S35, 2004. Suplemento 1.

ANANTHAN, R.; LATHA, M.; RAMKUMAR, K.M.; PARI, L.; BASKAR, C.; NARMATHA, B.V. Modulatory effects of *Gymnema montanum* leaf extract on alloxan-induced oxidative stress in Wistar rats. **Nutrition**, v. 20, p. 280-285, 2004.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. *Moringa oleifera*: A food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.

AOAC. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemists**. 15. ed. The Association: Arlington, VA, 1990. Método 960.52.

ANVISA. Resolução nº 90, de 16 de março de 2004. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 mar. 2004.

AWODELE, O.; OREAGBA, I.A.; ODOMA, S.; SILVA, J.A.T.; OSUNKALU, V.O. Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 330-336, 2012.

AZEVEDO, C.R.; MACIEL, F.M.; SILVA, L.B.; FERREIRA, A.T.S.; CUNHA, M.; MACHADO, O.L.T.; FERNANDES, K.V.S.; OLIVEIRA, A.E.A.; XAVIER-FILHO, J. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 1435-1444, 2006.

BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Soil Science**, v. 20, p. 961-969, 1989.

BAILEY, C.J.; KRENTZ, A.J. Oral antidiabetic agents. In: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 452-477.

BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M.; HOMAYOUNFAR, H.; HOSSEINI, M. Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 139-144, 2003.

BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, p. 19-28, 2003.

BARG, S.; MA, X.; ELIASSON, L.; GALVANOVSKIS, J.; GOPEL, S.O.; OBERMULLER, S.; PLATZER, J.; RENSTROM, E.; TRUS, M.; ATLAS, D.; STRIESSNIG, J.; RORSMAN, P. Fast exocytosis with few Ca²⁺ channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. **Biophysical Journal**, v. 81, p. 3308-3323, 2001.

BASU, A.; JENSEN, M.D. Fat metabolism in diabetes. *In*: KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J.; JACOBSON, A.M. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Boston: Joslin Diabetes Center, 2005. p. 265-273.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BEEBE, C.A.; Nutritional management in type 1 diabetes. *In*: SPERLING, M.A. **Type 1 diabetes**. Etiology and treatment. New Jersey: Humana Press, 2003. p. 261-276.

BIERER, D. E. DUBENKO, L.G.; ZHANG, P.; LU, Q.; IMBACH, P.A.; GAROFALO, A.W.; PHUAN, P-W.; FORT, D.M.; LITVAK, J.; GERBER, R.E.; SLOAN, B.; LUO, J.; COOPER, R.; REAVEN, G.M. Antihyperglycemic activities of cryptolepine analogues: a ethnobotanical lead structure isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. **Journal of Medical Chemistry**, v. 41, p. 2754-2764, 1998.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSSA, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BNOUHAM, M.; MEKHFI, H.; LEGSSYER, A.; ZIYYAT, A. Ethnopharmacology Forum. Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. **International Journal of Diabetes and Metabolism**, v. 10, p. 33-50, 2002.

BONNER-WEIR, S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. **Endocrinology**, v. 141, p. 1926-1929, 2000.

BOSCO, A. LERÁRIO, A.C.; SORIANO, D.; SANTOS, R.F.; MASSOTE, P.; GALVÃO, D.; FRANCO, A.C.H.M.; PURISCH, S.; FERREIRA, A.F. Retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 49, 217-227, 2005.

BOUWENS, L.; ROOMAN, I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 1255-1270, 2005.

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

BRASS, B.J.; ABELEV, Z.; LIAO, E.P.; PORETSKY, L. Endocrine Pancreas. *In*: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 37-55.

BRISSOVA, M.; POWERS, A.C. Architecture of pancreatic islets. *In*: SEINO, S.; BELL, G.I. **Pancreatic beta cell in health and disease**. Hong-Kong: Springer, 2008. p. 3-11.

- BRUNO, R.M.; GROSS, J.L. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis. A 3.6-year follow-up study. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 14, p. 266-271, 2000.
- BUTLER, A.E.; JANSON, J.; BONNER-WEIR, S.; RITZEL, B.; RIZZA, R.A.; BUTLER, B.C. β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, p. 102-110, 2003.
- CABRERA, O.; BERMAN, D.M.; KENYON, N.S.; RICORDI, C.; BERGGREN, P-O.; CAICEDO, A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 2334-2339, 2006.
- CANAVAN, R.J.; UNWIN, N.C.; KELLY, W.F.; CONNOLLY, V.M.. Diabetes and nondiabetes-related lower extremity amputation incidence before and after the introduction of better organized diabetes foot care: continuous longitudinal monitoring using a standard method. **Diabetes Care**, v. 31, p. 459-463, 2008.
- CARNEY, J.R. KRENISKY, J.M.; WILLIAMSON, R.T.; LUO, J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the south american medicinal plant *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 203-205, 2002.
- CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTE, Z.B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, p. 304-312, 2006.
- CHAN, S.J.; STEINER, D.J. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. **American Zoology**, v. 40, p. 213-222, 2000.
- CHARLTON, M., NAIR, K.S. Protein Metabolism in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 323S-327S, 1998. Suplemento 2.
- CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS' (CTT) COLLABORATORS. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. **Lancet**, v. 371, p. 117-125, 2008.
- CHOPRA, M.; GALBRAITH, S.; DARNTON-HILL, I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 80, p. 952-958, 2002.
- CHRISTOPHER, R.J.; TAKEUCHI, K.; LEE, B. Rodent models of diabetes. In: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 165-178.
- CIARALDI, T.P. Cellular mechanisms of insulin action. In: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 75-87.
- COLHOUN, H.M.; BETTERIDGE, D.J.; DURRINGTON, P.N.; HITMAN, G.A.; NEIL, H.A.W.; LIVINGSTONE, S.J.; THOMASON, M.J.; MACKNESS, M.I.; CHARLTON-MENYS, V.; FULLER, J.H. Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 364, p. 685-696, 2004.

COLLIER, E.; WATKINSON, A.; CLELAND, C.F.; ROTH, J. Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 6238-6247, 1987.

CRYER, P.E.; DAVIS, S.N.; SHAMOON, H. Hypoglycemia in diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1902-1912, 2003.

CZECH, M.P.; LYNN, W.S. Stimulation of glucose metabolism by lectins in isolated white fat cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 297, p. 368-377, 1973.

DAS, A. K.; MANDAL, S.C.; BANERJEE, S.K.; SINHA, S.; SAHA, B.P.; PAL, M. Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 628-629, 2001.

DE VOS, A.; HEIMBERG, H.; QUARTIER, E.; HUYPENS, P.; BOUWENS, L.; PIPELEERS, D.; SCHUIT, F. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 2489-2495, 1995.

DELLI, A.J.; LARSSON, H.E.; IVARSSON, S-A.; LERNMARK, A. Type 1 diabetes. Autoimmune type 1 diabetes. In: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 141-152.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. Resource utilization and costs of care in the diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care**, v. 18, p. 1468-1478, 1995.

_____. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes *mellitus*. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 977-986, 1993.

DIAS, R.J.S.; CARNEIRO, A.P. Neuropatia diabética: fisiopatologia, clínica e eletroneuromiografia. **Acta Fisiátrica**, v. 7, p. 35-44, 2000.

DINKOVA, T.D.; AGUILAR, R.; JIMÉNEZ, S. Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. **Biochemical Journal**, v. 351, p. 825-831, 2000.

DONATH, R.Y.; STORLING, J.; BERCHTOLD, L.A.; BILLESTRUP, N.; MANDRUP-POULSEN, T. Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 334-350, 2008.

DOR, Y.; BROWN, J.; MARTINEZ, O.I.; MELTON, D.A. Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. **Nature**, v. 429, p. 41-46, 2004.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; DORES, R.G.R.; FABRES, M.H.A.; NAGEM, T.G. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 488-500, 2009.

EIDI, A.; EIDI, M.; HAERI, R.A.; BASATI, F. Hypoglycemic effect of ethanolic extract of *Carum carvi* L. seeds in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Medicinal Plants**, v. 9, n. 35, p. 106-113, 2010.

EKOÉ, J.-M.; ZIMMET, P.Z.; YALE, J.-F. The clinical syndrome and the biochemical definition. In: EKOÉ, J.-M.; REWERS, M.; WILLIAMS, R.; ZIMMET, P. **The epidemiology of diabetes mellitus**. 2. ed. Chichester: Wiley, 2008. p. 5-9.

GURGUL-CONVEY, E.; LENZEN, S. Relative importance of cellular uptake and reactive oxygen species for the toxicity of alloxan and dialuric acid to insulin-producing cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, p. 825-834, 2006.

ETUK, E.U. Animals models for studying diabetes mellitus. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 1, p. 130-134, 2010.

FAHEY, J.W. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**. Disponível em: <<http://www.tfljournal.org/article.php/20051201124931586>>. Acesso em: 04 jul. 2012.

FAKURAZI, S.; HAIRUSZAH, I.; NANTHINI, U. *Moringa oleifera* Lam prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2611-2615, 2008.

FERRANNINI, E.; GASTALDELLI, A.; MIYAZAKI, Y.; MATSUDA, M.; MARI, A.; DEFONZO, R.A. Beta-cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 493-500, 2005.

FERREIRA, P.M.P.; FARIAS, D.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; CARVALHO, A.F.U. *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

FERREIRA, S.R.G. Aspectos epidemiológicos do diabetes mellitus e seu impacto no indivíduo e na sociedade. In: ALBUQUERQUE, R.; NETTO, A.P. **Diabetes na prática clínica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011. Disponível em: <<http://www.diabetesebook.org.br/modulo-1/2-aspectos-epidemiologicos-do-diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade>>. Acesso em: 16 fev. 2012.

FONSECA, V.; JOHN-KALARICKAL, J. Type 2 Diabetes Mellitus: Epidemiology, Genetics, Pathogenesis, and Clinical Manifestations. In: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 203-220.

FORT, D. M.; RAO, K.; JOLAD, S.D.; CARLSON, T.J.; KING, S.R. Antihyperglycemic activity of *Teramnus labialis* (Fabaceae). **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 465-467, 2000.

FOWLER, M.J. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 26, p. 77-82, 2008.

FRANCIS, J.A.; JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L.K.; NAIR, M.G. Insulin secretagogues from *Moringa oleifera* with cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation inhibitory activities. **Helvética Chimica Acta**, v. 87, p. 317-326, 2004.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p. 499-502, 1972.

FROGUEL, P.; VELHO, G. Genetic determinants of type 2 diabetes. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 91-106, 2001.

GALLÃO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, p.106-109, 2006.

GANDHI, G.R.; IGNACIMUTHU, S.; PAULRAJ, M.G. Hypoglycemic and β -cells regenerative effects of *Aegle marmelos* (L.) Corr. Bark extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1667-1674, 2012.

GENUTH, S. Type 1 diabetes mellitus. In: DALE, D.C.; FEDERMAN, D.D. **ACP Medicine**. New York: WebMD, 2008. Seção 9, capítulo 1. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acpmedicine/4497/diabetes_melito_tipo_1.htm>. Acesso em: 27 ago. 2012.

GERICH, J.E. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. **Endocrine Reviews**, v. 19, p. 491-503, 1998.

GERSHENZON, J. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2004. p. 309-334.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Pathogenesis of microvascular complications. In: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 555-574.

GOKCE, G.; HAZNEDAROGLU, M.Z. Evaluation of antidiabetic, antioxidant and vasoprotective effects of *Posidonia oceanica* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 122-130, 2008.

GOODMAN, D.B.P.; DAVIS, W.L. Insulin accelerates the post germinative development of several fat storing seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 190, p. 440-446, 1993.

GOUGEON, R.; MORAIS, J.A.; CHEVALIER, S.; PEREIRA, S.; LAMARCHE, M.; MARLISS, E.B. Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 31, p. 128-133, 2008.

GOYAL, B.R.; AGRAWAL, B.B.; GOYAL, R.K.; MEHTA, A.A. Phyto-pharmacology of *Moringa oleifera* Lam. An overview. **Natural Product Radiance**, v. 6, p. 347-353, 2007.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSK, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNEMBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GROVER, J.K.; VATS, V.; RATHI, S.S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 461-470, 2000.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S.S.; DAWAR, R. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 233-236, 2001.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Effect of feeding *Murraya koenigii* and *Brassica juncea* diet kidney functions and glucose levels in streptozotocin diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 1-5, 2003.

_____. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 81-100, 2002.

GRUNDY, S.M. Metabolic complications of obesity. **Endocrine**, v. 13, p. 155-165, 2000.

GUERROUÉ, J-L.L.; DOUILLARD, R.; CEREDA, M.P.; CHIARELLO, M.D. As proteínas de folhas de mandioca: aspectos fisiológicos, nutricionais e importância tecnológica. **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos (B.CEPPA)**, v. 14, p. 133-148, 1996.

GUEVARA, A.P.; VARGAS, C.; SAKURAI, H.; FUJIWARA, F.; HASHIMOTO, K.; MAOKA, T.; ITO, Y.; TOKUDA, H.; NISHINO, H. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutation Research**, v. 440, p. 181-188, 1999.

GUILAM, M.T.; DUPRAZ, P.; THORENS, B. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. **Diabetes**, v. 49, p. 1485-1491, 2000.

HANNINEN, A.; JALKANEN, S.; SALMI, M.; TOIKKANEN, S.; NIKOLAKAROS, G.; SIMELL, O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, p. 1901-1910, 1992.

HARVEY, R.; FERRIER, D. **Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. 520p.

HEART PROTECTION STUDY COLLABORATIVE GROUP. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 360, p. 7-22, 2002.

HEBERT, S.L.; NAIR, K.S. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 13-17, 2010.

HEDO, J.A.; HARRISON, L.C.; ROTH, J. Binding of insulin receptors to lectins: evidence for common carbohydrate determinants on several membrane receptors. **Biochemistry**, v. 20, p. 3385-3393, 1981.

HERMANN, R.; BARTSOCAS, C.S.; SOLTESZ, G.; VAZEOU, A.; PASCHOU, P.; BOZAS, E.; MALAMITSI-PUCHNER, A.; SIMELL, O.; KNIP, M.; ILONEN, J. Genetics creening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA Class II alleles as disease markers. A comparison between three European populations with variable rates of disease incidence. **Diabetes/Metabolism Research Reviews**, v. 20, p. 322-329, 2004.

HUGHES, K.; CHO, M.; KUPERAN, P.; ONG, C.N.; AW, T.C. Cardiovascular risk factors in non-insulin-dependent diabetics compared to non-diabetic controls: a population-based survey among Asians in Singapore. **Atherosclerosis**, v. 136, p. 25-31, 1998.

JAISWAL, D.; RAI, P.K.; KUMAR, A.; MEHTA, S.; WATAL, G. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 392-396, 2009.

JERUMS, G.; PANAGIOTOPOULOS, S.; MacISAAC, R.J. Diabetic nephropathy: epidemiology and clinical description. In: BONER, G.; COOPER, M.E. **Management of diabetic nephropathy**. London: Taylor & Francis Group, 2003. p. 44-73.

JIMÉNEZ, S.; BELTRÁN-PENÁ, E.; ORTÍZ-LÓPEZ, A. Insulin-stimulated ribosomal protein synthesis in maize embryonic axes during germination. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 148-154, 1999.

JONES, P.M.; PERSAUD, S.J. Islet function and insulin secretion. In: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 87-103.

KAHN, S.E. The importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 4047-4058, 2001.

_____. The importance of the β -cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 2S-8S, 2000. Suplemento 1.

KANG, K.A. CHAE, S.; KOH, Y.S.; KIM, J.S.; LEE, J.H.; YOU, H.J.; HYUN, J.W. Protective effect of *Puerariae Radix* on oxidative stress induced by hydrogen peroxide and streptozotocin. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 1154-1160, 2005.

KAR, A.; CHOUDHARY, B.K.; BANDYOPADHYAY, N.G. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 105-108, 2003.

KARIM, Z.; HUSAIN, Q. Removal of anthracene from model wastewater by immobilized peroxidase from *Momordica charantia* in batch process as well as in a continuous spiral-bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 302-310, 2010.

KASIVISWANATH, R.; RAMESH, A.; KUMAR, K.E. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Gmelina asiatica* Linn. in normal and in alloxan induced diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 4, p. 729-732, 2005.

KAVALALI, G.; TUNCEL, H.; GOKSEL, S.; HATEMI, H.H. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 241-245, 2003.

KAVITHA, M.; BOBBILI, K.B.; SWAMY, M.J. Differential scanning calorimetric and spectroscopic studies on the unfolding of *Momordica charantia* lectin. Similar modes of thermal and chemical denaturation. **Biochimie**, v. 92, p. 58-64, 2010.

KEARNEY, M.T.; DUNCAN, E.R.; KAHN, M.; WHEATCROFT, S.B. Insulin resistance and endothelial cell dysfunction: studies in mammalian models. **Experimental Physiology**, v. 93, p. 158-163, 2007.

- KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2548-2556, 2004.
- KHANNA, P.; JAIN, S.C. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 6, p. 648-655, 1981.
- KHANNA, P.; NAG, N.G.; CHANDRAJAIN, S.; MOHAN, S. Process for isolation of insulin from plant source. UNITED STATES PATENT. Patente n. 3.945.988, 23 mar. 1976.
- KITABCHI, A.E. UMPEIRREZ, G.E.; MURPHY, M.B.; BARRETT, E.J.; KREISBERG, R.A.; MALONE, J.I.; WALL, B.M. Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 1, p. 131-153, 2001.
- KNOPP, R.H.; D'EMDEN, M.; SMILDE, J.G.; POCOCK, S.J.; Efficacy and safety of atorvastatin in the prevention of cardiovascular end points in subjects with type 2 diabetes. The Atorvastatin Study for Prevention of Coronary Heart Disease Endpoints in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (ASPEN). **Diabetes Care**, v. 29, p. 1478-1485, 2006.
- KRUSZYNSKA, Y.T.; YU, J.G.; OLEFSKY, J.M.; SOBEL, B.E. Effects of troglitazone on blood concentrations of plasminogen activator inhibitor 1 in patients with type 2 diabetes and in lean and obese normal subjects. **Diabetes**, v. 49, p. 633-639, 2000.
- KUBO, H. KOBAYASHI, J.; HIGASHIYAMA, K.; KAMEI, J.; FUJII, Y.; OHMIYA, S. The hypoglycemic effect of (7R, 9aS)-7-phenyl-octahydroquinolizin-2-one in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1114-1117, 2000.
- KUMAR, D.; KUMAR, S.; KOHLI, S.; ARYA, R.; GUPTA, J. Antidiabetic activity of methanolic bark extract of *Albizia odoratissima* Benth. in alloxan induced diabetic albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 1, p. 900-903, 2011.
- KUNYANGA, C.N.; IMUNGI, J.K.; OKOTH, M.W.; BIESALSKI, H.K.; VADIVEL, V. Total phenolic content, antioxidant and antidiabetic properties of methanolic extract of raw and traditionally processed Kenyan indigenous food ingredients. **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, p. 269-276, 2012.
- LAAKSO, M. Epidemiology of type 2 diabetes. In: GOLDSTEIN, B.J.; MULLER-WIELAND, D. **Type 2 diabetes: Principles and practice**. 2. ed. New York: Informa Healthcare, 2008. p. 1-11.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679-685, 1970.
- LAMBA, S.S.; BUCH, K.Y.; LEWIS, H.; LAMBA, J. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 21, p. 457-496, 2000.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.
- LEROITH, D.; SHILOACH, J.; HEFFRON, R.; RUBINOVITZ, C.; TANENBAUM, R.; ROTH, J. Insulin-related material in microbes: similarities and differences from mammalian insulins. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 63, n. 8, p. 839-849, 1985.
- LEVETAN, C. Distinctions between islet neogenesis and β -cell replication: implications for reversal of type 1 and 2 diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 2, p. 76-84, 2010.

- LEU, J.P.; ZONSZEIN, J. Diagnostic Criteria and Classification of Diabetes. *In*: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 107-115.
- LI, W.L.; ZHENG, H.C.; BUKURU, J.; KIMPE, N.D. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21, 2004.
- LIMA, V.B.S.; SAMPAIO, F.A.; BEZERRA, D.L.C.; NETO, J.M.M.; MARREIRO, D.N. Parameters of glycemic control and their relationship with zinc concentrations in blood and with superoxide dismutase enzyme activity in type 2 diabetes patients. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 55, p. 701-707, 2011.
- LINGOHR, M.K.; BUETTNER, R.; RHODES, C.J. Pancreatic β -cell growth and survival - a role in obesity-linked type 2 diabetes? **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, p. 375-384, 2002.
- LINO, C.S.; DIÓGENES, J.P.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.; ANDRADE NETO, M.; ALVES, R.S.; QUEIROZ, M.G.; SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- _____. Soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Methods in Enzimology**, v.28, p. 360-368, 1972.
- LONG, A.E.; GOONERATNE, A.T.; ROKNI, S.; WILLIAMS, A.J.; BINGLEY, P.J. The role of autoantibodies to zinc transporter 8 in prediction of type 1 diabetes in relatives: lessons from the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) Cohort. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, p. 632-637, 2012.
- MA, R.C.W.; TONG, P.C.Y. Epidemiology of type 2 diabetes. *In*: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 45-68.
- MAI, T.T.; CHUYEN, N.V. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, p. 69-76, 2007.
- MALLONE, R.; ENDERT, P.V. T cells in the pathogenesis of type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 8, p. 101-106, 2008.
- MALMBERG, K.; RYDEN, L.; HAMSTEN, A.; HERLITZ, J.; WALDENSTROM, A.; WEDEI, H. Effects of insulin treatment on cause-specific one-year mortality and morbidity in diabetic patients with acute myocardial infarction. **European Heart Journal**, v. 17, p. 1337-1344, 1996.
- MANOSROI, J.; MOSES, Z.Z.; MANOSROI, W.; MANOSROI, A. Hypoglycemic activity of Thai medicinal plants selected from the Thai/Lanna Medicinal Recipe Database MANOSROI II. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 92-98, 2011.

MARUKAMI, T.; KISHI, A.; YOSHIWAWA, M. Medicinal flowers IV. Marigold: structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from egyptian *Calendula officinalis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, p. 974-978, 2001.

MATHEWS, C.E.; LEITER, E.H. Rodent for the study of diabetes. *In*: KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J.; JACOBSON, A.M **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Boston: Joslin Diabetes Center, 2005. p. 291-327.

MEHTA, A.; AGRAWAL, B. Investigation into the mechanism of action of *Moringa oleifera* for its anti-asthmatic activity. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**, v.8, p. 24-31, 2008.

MEHTA, L.K.; BALARAMAN, R.; AMIN, A.H.; BAFNA, P.A.; GULATI, O.D. Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 191-195, 2003.

MENTREDDY, S.R. Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 743-750, 2007.

MEYER, J.; STURIS, J.; KATSCHINSKI, M.; ARNOLD, R.; GOKE, B.; BYRNE, M.M. Acute hyperglycemia alters the ability of the normal beta-cell to sense and respond to glucose. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 282, p. 917-922, 2002.

MODESTI, C.F.; CORREA, A.D.; OLIVEIRA, E.D.; ABREU, C.M.P.; SANTOS, C.D. Caracterização de concentrado proteico de folhas de mandioca obtido por precipitação com calor e ácido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 464-469, 2007.

MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

MORRAN, M.P.; MCINERNEY, M.F.; PIETROPAOLO, M. Innate and adaptive autoimmunity in type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes**, v. 9, p. 152-161, 2008.

MOURA, A.S.; SOUZA, A.L.G.; JUNIOR, A.M.O.; LIRA, M.L.; SILVA, G.F. Caracterização físico-química da folha, flor e vagem da *Moringa (Moringa oleifera)* Lamarck). *In*: **ENCONTRO NACIONAL DE MORINGA**, 2009, Aracaju. Disponível em: <linux.alfamaweb.com.br/encontromoringa.../04-04-ENAM2009.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2012.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P.K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 497-501, 2005.

NAEM, S.; ALI, M.; MAHMOOD, A. Optimization of extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 535-541, 2012.

NAIN, P.; SAINI, V.; SHARMA, S.; NAIN, J. Antidiabetic and antioxidant potential of *Emblica officinalis* Gaertn. Leaves extract in streptozotocin-induced type-2 diabetes mellitus (T2DM) rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 65-71, 2012.

- NAIR, K.S.; FORD, G.C.; EKBERG, K.; FERNQVIST-FORBES, E.; WAHREN, J. Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type 1 diabetic patients. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2926-2937, 1995.
- NARAYAN, K.M.V.; BOYLE, J.P.; THOMPSON, T.J.; GREGG, E.D.; WILLIAMSON, D.F. Effect of BMI on lifetime risk for diabetes in the U.S. **Diabetes Care**, v. 30, p. 1562-1566, 2007.
- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K.S.; TALBOT, B.G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, p. 703-710, 1995.
- NDONG, M.; UEHARA, M.; KATSUMATA, S-I.; SUZUKI, K. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, p. 229-233, 2007.
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p., 2005.
- NEWSHOLME, P.; HABER, E.P.; HIRABARA, S.M.; REBELATO, E.L.O.; PROCOPIO, J.; MORGAN, D.; OLIVEIRA-EMILIO, H.C.; CARPINELLI, A.R.; CURI, R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **Journal of Physiology**, v. 583, p. 9-24, 2007.
- NG, T.B.; LI, W.W.; YEUNG, H.W. Effects of lectins with various carbohydrate binding specificities on lipid metabolism in isolated rat and hamster adipocytes. **International Journal of Biochemistry**, v. 21, p. 149-155, 1989.
- NG, T.B.; WONG, C.M.; LI, W.W.; YEUNG, H.W. Horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) lectin but not garden snail (*Helix pomatia*) lectin elicits insulin-like activities *in vitro*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 81B, p. 503-504, 1985.
- _____. Isolation and characterization of a galactose binding lectin with insulinomimetic activities. From the seeds of the bitter melon *Momordica charantia* (Family Cucurbitaceae). **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 28, p. 163-172, 1986.
- NIKKON, F.; SAUD, Z.A.; RAHMAN, M.H.; HAQUE, M.E. *In vitro* antimicrobial activity of the compound isolated from chloroform extract of *Moringa oleifera* Lam. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 22, p. 1888-1890, 2003.
- NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X.L.; YAMAGISHI, S-I.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M.A.; BEEBE, D.; OATES, P.J.; HAMMES, H-P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-790.
- NOBLE, J.A.; VALDEZ, A.M.; COOK, M.; KLITZ, W.; THOMSON, G.; ERLICH, H.A. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 caucasian, multiplex families. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, p. 1134-1148, 1996.
- OJEWOLE, J. A. O. Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* (willd) Hook methanolic root extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 231-237, 2002.

- OKYAR, A.; CAN, A.; AKEV, N.; BAKTIR, G.; SUTLUPINAR, N. Effect of *Aloe vera* leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 157-161, 2001.
- OLIVEIRA, A.E.A.; MACHADO, O.L.T.; GOMES, V.M.; NETO, J.X.; PEREIRA, A.C.; VIEIRA, J.G.H.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. Jack bean seed coat contains a protein with complete sequence homology to bovine insulin. **Protein and Peptide Letters**, v. 6, p. 15-21, 1999.
- OLIVEIRA, F., SAITO, M.L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2-3-4, p. 170-196, 1989.
- OLIVEIRA, J.T.A.; GONDIM, D.M.F.; VASCONCELOS, I.M. Ensaio enzimáticos de proteínas e inibidores de proteases envolvidos com a defesa de plantas a patógenos. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SANTOS, C.E.R.S.S.; STAMFORD, N.P. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Textos de apoio e protocolos experimentais. EMBRAPA, 2010. p. 61-92.
- OZOUGWU, J.C. Anti-diabetic effects of *Allium cepa* (onions) aqueous extracts on alloxan-induced diabetic *Rattus norvegicus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 1134-1139, 2011.
- PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315-424, 2007.
- PARI, L.; LATHA, M. Effect of *Cassia auriculata* flowers on blood sugar levels, serum and tissue lipids in streptozotocin diabetic rats. **Singapore Medical Journal**, v. 43, n.12, p. 617-621, 2002.
- PARI, L.; SATHEESH, M.A. Antidiabetic activity of *Boerhaavia diffusa* L.: effect on hepatic key enzymes in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 109-113, 2004.
- PEIXOTO, P. H. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 137-143, 1999
- PEREIRA, M.L.; OLIVEIRA, H.D.; OLIVEIRA, J.T.; GIFONI, J.M.; ROCHA, R.O.; SOUSA, D.O.; VASCONCELOS, I.M. Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.
- PIHOKER, C.; GILLIAM, L.K.; HAMPE, C.S.; LERNMARK, A. Autoantibodies in diabetes. **Diabetes**, v. 54, p. S52-S61, 2005. Suplemento 2.
- PNEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.
- POITOUT, V.; ROBERTSON, R.P. Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v. 143, p. 339-342, 2002.

POLONSKY, K.S.; STURIS, J.; BELL, G.I. Noninsulin-dependent diabetes mellitus: a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 777-783, 1996.

PRATLEY, R.E.; WEYER, C. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 44, p. 929-945, 2001.

PRINCE, P.S.M.; KAMALAKKANNAN, M.; MENON, V.P. *Syzigium cumini* seed extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 205-209, 2003.

PURRELLO, F.; BURNHAM, D.B.; GOLDFINE, I.D. Insulin receptor antiserum and plant lectins mimic the direct effects of insulin on nuclear envelope phosphorylation. **Science**, v. 221, p. 462-464, 1983.

QUADROS, A.; DIEMER, F.; LIMA, T.; ABDALLA, R.; VIZOTTO, M.; GOTTSCHALL, C.A.M.; SCHAAN, B.D. Intervenção coronária percutânea no diabetes mellitus: análise da prática médica atual. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, p. 327-333, 2007.

RAJASEKARAN, S.; SIVAGNANAM, K.; SUBRAMANIAN, S. Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 90-96, 2005

RAJASEKHAR, M.D.; BADRI, K.R.; KUMAR, K.V.; BABU, K.R.; FATIMA, S.S.; KUMAR, M.T.S.; RAO, C.A. Isolation and characterization of a novel antihyperglycemic protein from the fruits of *Momordica cymbalaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 58-62, 2010.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*) a multipurpose Indian vegetable. **Economy Botany**, v.34, p.276-283, 1980.

RAMACHADRAN, S.; RAJASEKARAN, A.; KUMAR, K.T.M. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant potential of methanol extract of *Tectona grandis* flowers in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 624-631, 2011.

RAMACHADRAN, S.; RAJASEKARAN, A.; MANISENTHILKUMAR, K.T. Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 262-268, 2012.

RASK-MADSEN, C.; HE, Z.; KING, G.L. Mechanisms of diabetic microvascular complications. In: KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J.; JACOBSON, A.M. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Boston: Joslin Diabetes Center, 2005. p. 823-837.

RATHI, B.S.; BODHANKAR, S.L.; BAHETI, A.M. Evaluation of aqueous leaves of *Moringa oleifera* Linn for wound healing in albino rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, p. 989-901, 2006.

- RATHI, S. S.; GROVER, J.K.; VIKRANT, V.; BISWAS, N.R. Prevention of experimental diabetic cataract by Indian Ayurvedic plant extracts. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 774-777, 2002.
- REES, D.A.; ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetes Medicine**, v. 22, p. 359-370, 2005.
- RHODES, C.J.; SHOELSON, S.; HALBAN, P.A. Insulin biosynthesis, processing and chemistry. *In*: KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J.; JACOBSON, A.M. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Boston: Joslin Diabetes Center, 2005. p. 65-82.
- RICHARDSON, C.C.; HUSSAIN, K.; JONES, P.M.; PERSAULD, S.; LOBNER, K.; BOEHM, A.; CLARK, A.; CHRISTIE, M.R. Low levels of glucose transporters and K⁺ATP channels in human pancreatic beta cells early in development. **Diabetologia**, v. 50, p. 1000-1005, 2007.
- RIO, D.D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, p. 316-328, 2005.
- ROY, M.S.; KLEIN, R.; O'COLMAIN, B.J.; KLEIN, B.E.; MOSS, S.E.; KEMPEN, J.H. The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic persons in the United States. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, p. 546-551, 2004.
- RYAN, E.A.; PICK, M.E.; MARCEAU, C. Use of alternative medicines in diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 18, p. 242-245, 2001.
- SABU, M. C.; KUTTAN, R. Antidiabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 155-160, 2002.
- SACKS, F.M.; TONKIN, A.M.; SHEPHERD, J.; BRAUNWALD, E.; COBBE, S.; HAWKINS, C.M.; KEECH, A.; PACKARD, C.; SIMES, J.; BYINGTON, R.; FURBERG, C.D. Effect of pravastatin on coronary disease events in subgroups defined by coronary risk factors : The Prospective Pravastatin Pooling Project. **Circulation**, v. 102, p. 1893-1900, 2000.
- SALPETER, S.J.; DOR, Y. Beta-cell replication. *In*: SEINO, S.; BELL, G.I. **Pancreatic beta cell in health and disease**. Hong-Kong: Springer, 2008. p. 245-263.
- SANGER, F. Chemistry of insulin. **Science**, v. 129, p. 1340-1344, 1959.
- SATHE, S.K.; SZE-TAO, K.W.C.; WOLF, W.J.; HAMAKER, B.R. Biochemical characterization and in vitro digestibility of the major globulin in cashew nut (*Anacardium occidentale*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2854-2860, 1997.
- SATO, K.L.; MIGLIACCIO, V.; CARMO, J.M.; OLIVETI, M.C.D.B.B.; FERREIRA, R.S.; FAZAN, V.P.S. Diabetes como modelo de neuropatia autonômica. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 39, p. 28-38, 2006.
- SCANLON, P.H. Diabetic Retinopathy. *In*: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 575-598.

- SCHAAN, B.D.; HARZHEIM, E.; GUS, I. Cardiac risk profile in diabetes mellitus and impaired fasting glucose. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, p. 529-536, 2004.
- SCHEFFEL, R.S.; BORTOLANZA, D.; WEBER, C.S.; COSTA, L.A.; CANANI, L.H.; SANTOS, K.G.; CRISPIM, D.; ROISENBERG, I.; LISBÔA, H.R.K.; TRES, G.S.; TSCHIEDEL, B.; GROSS, J.L. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, p. 263-270, 2004.
- SHAN, J-J.; YANG, M.; REN, J.W.; Anti-diabetic and hypolipidemic effects of aqueous-extract from the flower of *Inula japonicain* alloxan-induced diabetic mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 455-459, 2006.
- SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87, p. 4-14, 2010.
- SHRAYYEF, M.Z.; GERICH, J.E. Normal glucose homeostasis. *In*: PORETSKY, L. **Principles of diabetes mellitus**. 2. ed. New York: Springer, 2009. p. 19-35.
- SIEHER, F.E.; TRAYSTMAN, R.J. Ethical issues involved in the development of animal models for type I diabetes. **ILAR Journal**, v. 35, 1993. Não paginado. Disponível em: <http://dels-old.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/35_1/35_1Ethical.shtml> Acesso em: 8 mar. 2012.
- SILVA, L.B.; SANTOS, S.S.S.; AZEVEDO, C.R.; CRUZ, M.A.L.; VENÂNCIO, T.M.; CAVALCANTE, C.P.; UCHÔA, A.F.; FILHO, S.A.; OLIVEIRA, A.E.A.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. The leaves of green plants as well as a cyanobacterium, a red alga, and fungi contain insulin-like antigens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 297-303, 2002.
- SINHA, M.; DAS, D.K.; BHATTACHARJEE, S.; MAJUMDAR, S.; DEY, E. Leaf extract of *Moringa oleifera* prevents ionizing radiation-induced oxidative stress in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 1167-1172, 2011.
- SKELIN, M.; RUPNIK, M.; CENCIC, A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. **ALTEX**, v. 27, p. 105-113, 2010.
- SMITH, J.D.; LIU, A.Y-C. Lectins mimic insulin in the induction of tyrosine aminotransferase. **Science**, v. 214, p. 799-800, 1981.
- SOMOVA, L. O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**, v. 10, p. 115- 121, 2003.
- SOWER, S.A.; SUZUKI, K.; REED, K.L. Perspective: Research activity of enteropancreatic and brain/central nervous system hormones across invertebrates and vertebrates. **American Zoology**, v. 40, p. 165-178, 2000.
- SQUIRES, E.J. **Applied animal endocrinology**. CABI Publishing: Cambridge, 2003. 234p.
- SRINIVASAN, K.; RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, p. 451-472, 2007.
- STEINER, D.F. The biosynthesis of insulin. *In*: SEINO, S.; BELL. G.I. **Pancreatic beta cell in health and disease**. Hong-Kong: Springer, 2008. p. 31-49.

STRAUB, S.G.; SHARP, G.W.G. The two phases of glucose-stimulated insulin secretion mechanisms and controls. *In*: LEROITH, D.; TAYLOR, S.I.; OLEFSKY, J.M. **Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p. 3-14.

STUMP, C.S.; NAIR, S. Alterations in protein metabolism in diabetes mellitus. *In*: KAHN, C.R.; WEIR, G.C.; KING, G.L.; MOSES, A.C.; SMITH, R.J.; JACOBSON, A.M. **Joslin's Diabetes Mellitus**. 14. ed. Boston: Joslin Diabetes Center, 2005. p. 275-290.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B.J.; van HAEFTEN, T. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **The Lancet**, v. 365, p. 1333-1346, 2005.

SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S.; AGASTIAN, P. Insulin secretagogue effect of *Ichnocarpus frutescens* leaf extract in experimental diabetes: A dose-dependent study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, p. 159-171, 2008.

SUZUKI, T.; MAKINO, H.; KANATSUKA, A.; OSEGAWA, M.; YOSHIDA, S.; SAKAMOTO, Y. Activation of insulin-sensitive phosphodiesterase by lectins and insulin-dextran complex in rat fat cells. **Metabolism**, v. 33, p. 572-576, 1984.

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

TANKO, Y.; OKASHA, M.A.; MAGAJI, G.M.; YERIMA, M.; YARO, A.H.; SALEH, M.I.A.; MOHAMMED, A. Anti-diabetic properties of *Securinega virosa* (Euphorbiaceae) leaf extract. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n.1, p. 22-24, 2008.

TASKINEN, M-R. Diabetic dyslipidemia. **Atherosclerosis Supplements**, v. 3, p. 47-51, 2002.

TATTERSALL, R.B. The history of diabetes mellitus. *In*: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 3-23.

TENDE, J.A.; EZEKIEL, I.; DIKKO, A.A.U.; GOJI, A.D.T. Effect of ethanolic leaves extract of *Moringa oleifera* on blood glucose levels of streptozocin-induced diabetics and normoglycemic wistar rats. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, p. 1-4, 2011.

TERRUZZI, I., SENESI, P.; MAGNI, C.; MONTESANO, A.; SCARAFONI, A.; LUZI, L.; DURANTI, M. Insulin-mimetic action of conglutin- δ , a lupin seed protein, in mouse myoblasts. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 21, p. 197-205, 2011.

THE EYE DISEASES PREVALENCE RESEARCH GROUP. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, p. 552-563, 2004.

THOMSON, G.; VALDEZ, A.M.; NOBLE, J.A.; KOCKUM, I.; FROTE, M.N.; NAIMAN, J.; ERLICH, H.A.; CUCCA, F.; PUGLIESE, A.; STEENKISTE, A.; DORMAN, J.S.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; HERMANN, R.; ILONONEN, J.; LAMBERT, A.P.; BINGLEY, P.J.;

GILLESPIE, K.M.; LERNMARK, A.; SANJEEVI, C.B.; RONNINGEN, K.S.; UNDLIEN, D.E.; THORSBY, E.; PETRONE, A.; BUZZETTI, R.; KOELEMAN, B.P.; ROEP, B.O.; SARUHA-DIRESKENELI, G.; UYAR, F.A.; GUNOZ, H.; GORODEZKY, C.; ALAEZ, C.; BOEHM, B.O.; MLYNARSKI, W.; IKEGAMI, H.; BERRINO, M.; FASANO, M.E.; DAMETTO, E.; ISRAEL, S.; BRAUTBAR, C.; SANTIAGO-CORTES, A.; FRAZER, T.; SHE, J.X.; BUGAWAN, T.L.; ROTTER, J.I.; ZEIDLER, A.; LEYVA-COBIAN, F.; HAWKINS, B.R.; CHAN, S.H.; CASTANO, L.; POCIOT, F.; NERUP, J. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. **Tissue Antigens**, v. 70, p. 110-127, 2007.

TIGANIS, T. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 82-89, 2011.

TODD, J.A.; WALKER, N.M.; COOPER, J.D.; SMYTH, D.J.; DOWNES, K.; PLAGNOL, V.; BAILEY, R.; NEJENTSEV, S.; FIELD, S.F.; PAYNE, F.; LOWE, C.E.; SZESZKO, J. S.; HAFLER, J.P.; ZEITELS, L.; YANG, J.H.M.; VELLA, A.; NUTLAND, S.; STEVENS, H.E.; SCHUILENBURG, H.; COLEMAN, G.; MAISURIA, M.; MEADOWS, W.; SMINK, L.J.; HEALY, B.; BURREN, O.S.; LAM, A.C.A.; OVINGTON, N.R.; ALLEN, J.; ADLEM, E.; LEUNG, H-T.; WALLACE, C.; HOWSON, J.M.M.; GUJA, C.; IONESCUTIRGOVISTE, C.; GENETICS OF TYPE 1 DIABETES IN FINLAND; SIMMONDS, M.J.; HEWARD, J.M.; GOUGH, S.C.L.; THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM; DUNGER, D.B.; WICKER, L.S.; CLAYTON, D.G. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. **Nature Genetics**, v. 39, p. 857-864, 2007.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v. 15, p. 115-121, 2006.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRICHES, C.; SCHAAN, B.D.; GROSS, J.L.; AZEVEDO, M.J. Complicações macrovasculares do diabetes melito: peculiaridades clínicas, de diagnóstico e manejo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 698-708, 2009.

TUOMILEHTO, J.; RASTENYTE, D.; JOUSILAHTI, P.; SARTI, C.; VARTIAINEN, E. Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke. Prospective study of the middle-aged finnish population. **Stroke**, v. 27, p. 210-215, 1996. Disponível em: <<http://stroke.ahajournals.org/content/27/2/210.long>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

TURNER, R.C.; MILLNS, H.; NEIL, H.A.; STRATTON, I.M.; MANLEY, S.E.; MATTHEWS, D.R.; HOLMAN, R.R. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23). **British Medical Journal**, v. 316, p. 823-828, 1998.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of

complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **The Lancet**, v. 352, p. 837-853, 1998.

ULICNA, O.; VANCOVÁ, O.; BOZEK, P.; CÁRSKY, J.; SEBEKOVÁ, K.; BOOR, P.; NAKANO, M.; GREKSÁK, M. Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) partially prevents oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Physiological Research**, v. 55, p. 157-164, 2006.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p.43-50, 1991.

VAAG, A.; HENRIKSEN, J.E.; MADSBAD, E.; HOLM, N.; BECK-NIELSEN, H. Insulin secretion, insulin action, and hepatic glucose production in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 690-698, 1995.

VALMADRID, C.T.; KLEIN, R.; MOSS, S.E.; KLEIN, B.E. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. **Archives of Internal Medicine**, v. 160, p. 1093-1100, 2000.

VELLA, A.; RIZZA, R.A. Metabolic disturbances in diabetes. *In*: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 215-226.

VENÂNCIO, T.M.; OLIVEIRA, A.E.A.; SILVA, L.B.; MACHADO, O.L.T.; FERNANDES, K.V.S.; XAVIER-FILHO, J. A protein with amino acid sequence homology to bovine insulin is present in the legume *Vigna unguiculata* (cowpea). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1167-1173, 2003.

VILJOEN, A.; WIERZBICKI, A.S. Dyslipidemia: diabetes lipid therapies. *In*: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 672-683.

WALDE, S.S.; DOHLE, C.; SCHOTT-OHLY, P.; GLEICHMANN, H. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. **Life Sciences**, v. 71, p. 1681-1694, 2002.

WATKINS, P.J.; AMIEL, S.A.; HOWELL, S.L.; TURNER, E. **Diabetes and its management**. 6. ed. Blackwell Publishing, 2003. 229p.

WIERUP, N.; SVENSSON, H.; MULDER, H.; SUNDLER, FF. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. **Regulatory Peptides**, v. 107, p. 63-69, 2002.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes**, v. 27, p. 1047-1053, 2004.

WILLIAMS, M.E.; STANTON, R.C. Diabetic kidney disease: current challenges. *In*: HIMMELFARB, J.; SAYEGH, M.H. **Chronic kidney disease, dialysis and transplantation**. 3. Ed. Philadelphia: Saunders, 2010. p. 39-56.

- WINK, M. Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. **Annual Plant Reviews**, v. 40, p. 1-19, 2010.
- XIE, J-T.; WANG, A.; MEHENDALE, S.; WU, J.; AUNG, H.H.; DEY, L.; QIU, S.; YUAN, C-S. Anti-diabetic effects of *Gymnema yunnanense* extract. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 323-329, 2003.
- XUE, W.; LEI, J.; LI, X.; ZHANG, R. *Trigonella foenum graecum* seed extract protects kidney function and morphology in diabetic rats via its antioxidant activity. **Nutrition Research**, v. 31, p. 555-562, 2011.
- YANG, C-Y.; WANG, J.; ZHAO, Y.; SHEN, L.; JIANG, X.; XIE, Z-G.; LIANG, N.; ZHANG, L.; CHEN, Z-H. Anti-diabetic effects of Panax notoginseng saponins and its major anti-hyperglycemic components. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 231-236, 2010.
- YEH, G.Y.; EISENBERG, D.M.; KAPTCHUK, O.M.D.; PHILLIPS, R.S. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1277-1294, 2003.
- YIBCHOK-ANUN, S.; ADISAKWATTANA, S.; YAO, C.Y.; S ANGVANICH, P. Slow acting protein extract from fruit pulp of *Momordica charantia* with insulin secretagogue and insulinomimetic activities. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1126-1131, 2006.
- YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; KAGEURA, T.; MATSUDA, H. Medicinal flowers. Marigold. Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory and gastroprotective principles and new oleanano-type, triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 7, p. 863-870, 2001.
- ZELMANOVITZ, T.; GERCHMAN, F.; BALTHAZAR, A.P.; THOMAZELLI, F.C.; MATOS, J.D.; CANANI, L.H. Diabetic nephropathy. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 1, n. 10, 2009.
- ZHANG, L.; YANG, J.; CHEN, X-Q.; ZAN, K.; WEN, X-D.; CHEN, H.; WANG, Q.; LAI, M-X. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 518-524, 2010.
- ZIEGLER, D. Diabetic peripheral neuropathy. *In*: HOLT, R.I.G.; COCKRAM, C.; FLYVBJERG, A.; GOLDSTEIN, B.J. **Textbook of diabetes**. 4. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. p. 615-634.