

MARIANA BRITO DANTAS

EFEITO DO ÁCIDO BETULÍNICO
NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIA E DIABETES EM CAMUNDONGOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Farmácia.

Orientador: Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

D214e Dantas, Mariana Brito
Efeito do ácido betulínico no tratamento de dislipidemia e diabetes em camundongos/ Mariana Brito Dantas. – 2011.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Biologia para Saúde.
Orientação: Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

1. Triterpenos 2. Diabetes mellitus 3. Dislipidemias I. Título.

CDD 615.1

MARIANA BRITO DANTAS

EFEITO DO ÁCIDO BETULÍNICO
NO TRATAMENTO DE DISLIPIDEMIA E DIABETES EM CAMUNDONGOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia.

Aprovada em 18/01/2012.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Universidade Federal do Ceará- UFC

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

Universidade Federal do Ceará- UFC

Aos meus pais, irmãos e ao Thiago, pelo
apoio em todos os momentos da minha vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus por saber que Ele me guia e me abençoa e que me dá a força e a paz necessária para alcançar meus objetivos

Em especial, aos meus pais José Othon Dantas Lopes e Maria de Brito Dantas pela educação, apoio, incentivo, confiança e amor que me encorajam a seguir estudando.

Aos meus irmãos Tereza, Paula e Othon Júnior pelo apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Ao meu namorado Thiago Colares pela paciência, amor, incentivo e compreensão nos momentos em que precisei está ausente.

A minha orientadora, Professora Maria Gorreti Rodrigues de Queiroz, pela confiança, pelos ensinamentos e pela forma carinhosa que nos orienta.

Aos membros da banca, as professoras Nylane Maria Nunes de Alencar e Romélia Pinheiro Gonçalves, por aceitarem meu convite.

Aos queridos alunos de iniciação científica do Laboratório de Bioquímica Clínica, Paulo Arthur, Diego, Richard, Renato, Hector e Nayane, meus sinceros agradecimentos, vocês foram essenciais para execução deste trabalho.

Ao professor Célio Lima de Melo pela atenção e disponibilidade em transmitir os seus conhecimentos, e ao colega, Tiago Melo, pela colaboração em diversos momentos desse estudo.

Agradeço, imensamente, aos grandes amigos que fiz no laboratório, Jamile Magalhães, Daniel Freire e Thamires Fontenele, pela contribuição em todos os momentos dessa trajetória, pelo maravilhoso convívio no laboratório, pelo apoio e pela amizade verdadeira construída ao longo desses anos.

Ao Professores Said Fonseca pelo auxílio na elaboração da dieta rica em colesterol.

A Professora Cléa Florenço e sua doutoranda Mariana Feitosa pela colaboração na avaliação da atividade antioxidante do ácido betulínico.

A Professora Otília Pessoa pelo isolamento do ácido betulínico.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT) pela utilização do espaço físico e dos equipamentos do LACT.

Enfim, agradeço profundamente a todos de participaram de alguma forma dessa conquista.

“Trabalha como se tudo dependesse de ti e confia como se tudo dependesse de Deus”.

Santo Inácio de Loyola

RESUMO

A prevalência da diabetes e das dislipidemias vem crescendo mundialmente configurando-se como uma epidemia resultante, principalmente, do excesso de peso, da inatividade física e da suscetibilidade genética. Existem relatos de muitos produtos de origem natural que possuem atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica. Dentre eles, podemos citar os terpenos, que constituem o maior grupo de produtos do metabolismo secundário de plantas. O terpeno estudado no presente trabalho é o ácido betulínico (AB), um triterpeno pentacíclico do tipo lupano que apresenta uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito hipolipidêmico e hipoglicêmico do AB em protocolos experimentais de dislipidemias e diabetes induzidas farmacologicamente bem como estudar seu potencial tóxico *in vivo*. Os grupos tratados com AB receberam as doses de 5(AB5), 10(AB10) e 20(AB20)mg/Kg. A avaliação da ação hipoglicêmica do AB foi através do protocolo de diabetes induzida por aloxano e o teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Para verificar sua atividade sobre o metabolismo lipídico, foi realizado o protocolo de indução da dislipidemia através da injeção intraperitoneal de triton WR 1339. Além disso, foi realizado o protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada. A toxicidade foi avaliada pela realização do estudo toxicológico de doses repetidas durante 28 dias mediante administração única diária por via oral de AB. Depois do protocolo de diabetes induzida por aloxano, observou-se uma redução da glicemia nos animais dos grupos AB10 e AB20. Os triglicérides e o colesterol total reduziram significativamente em todas as doses estudadas. O tratamento com AB10, reduziu ainda o pico glicêmico causado pela sobrecarga de glicose (2g/Kg) no TOTG. Após 24h da indução com triton, verificou-se a redução significativa dos triglicérides nos grupos tratados com AB nas doses de 10 e 20mg/Kg. Depois de 48h, os animais do grupo AB10 manteve tal redução. No protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada o AB nas doses de 10 e 20mg/Kg, promoveu uma diminuição significativa do colesterol total plasmático. Não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros avaliados após protocolo de toxicidade oral em doses repetidas. Os resultados obtidos demonstram o potencial terapêutico e a segurança do ácido betulínico no tratamento das dislipidemias e diabetes, apesar de serem necessários novos estudos pré-clínicos e clínicos para sua utilização no mercado.

Palavras-chave: Triterpenos. Diabetes mellitus. Dislipidemias.

ABSTRACT

Diabetes and dyslipidemia prevalence has been increasing globally configured as an epidemic resultant mainly from overweight, physical inactivity and genetic susceptibility. There are reports of many natural products that have hypoglycemic and hypolipidemic activity. Among them we mention the terpenes, which are the largest group of secondary products of plants metabolism. The terpene studied in this work was betulinic acid (BA), a pentacyclic triterpene lupano type that presents a variety of biological and pharmacological activities. The objective of this study was to evaluate BA hypoglycemic and hypolipidemic effects in experimental protocols of dyslipidemia and diabetes induced pharmacologically as well as studying their toxic potential in vivo. The BA-treated groups received doses of 5 (BA5), 10 (BA10) and 20 (BA20) mg/kg. The evaluation of the BA hypoglycemic action was carried out through diabetes induced by alloxan protocol and oral glucose tolerance test (OGTT). To check their activity on lipid metabolism, it was carried out dyslipidemia protocol induced by Triton WR 1339 intraperitoneal injection. In addition, it was performed the protocol modified diet-induced hypercholesterolemia. Toxicity was assessed by the study repeated doses for 28 days treating daily with BA doses via gavage. After the protocol of alloxan-induced diabetes, there was a blood glucose reduction in groups BA10 and BA20. Triglycerides and total cholesterol decreased significantly at all doses studied. BA10 treatment, also reduced the blood glucose peak caused by glucose overload (2g/Kg) in the OGTT. After 24 hours of dyslipidemia induced by triton, there was a significant triglycerides reduction in groups treated with BA at doses of 10 and 20mg/Kg. After 48h, triglycerides levels remained reduced in group treated with BA10. In hypercholesterolemia induced by diet modified protocol BA at doses of 10 and 20mg/kg, promoted a significant decrease in total cholesterol levels. There were no significant changes in the parameters evaluated after repeated dose oral toxicity protocol. Results demonstrate the therapeutic potential and safety of betulinic acid in the treatment of dyslipidemia and diabetes, although others pre-clinical and clinical studies are necessary for its use by population.

Key words: Betulinic Acid. Diabetes. Dyslipidemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido betulínico.....	24
Figura 2. Consequências metabólicas da deficiência ou resistência a insulina.....	27
Figura 3. Estrutura das lipoproteínas.....	30
Figura 4. Esquema do protocolo experimental de indução da diabetes pelo aloxano.....	38
Figura 5. Esquema do protocolo experimental do teste oral de tolerância a glicose.....	39
Figura 6. Esquema do protocolo experimental de indução de dislipidemia pelo triton WR-1339.....	40
Figura 7. Esquema do protocolo experimental de indução de hipercolesterolemia por dieta modificada.....	42
Figura 8. Esquema do protocolo experimental para avaliação da toxicidade oral de doses repetidas durante 28 dias.....	44
Figura 9. Efeito do ácido betulínico sobre a hiperglicemia induzida por aloxano após tratamento de 7 dias.....	46
Figura 10. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de colesterol total, no modelo de diabetes induzida por aloxano, após tratamento de 7 dias.....	47
Figura 11. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de triglicédeos, no modelo de diabetes induzida por aloxano, após tratamento de 7 dias.....	48
Figura 12. Efeito do ácido betulínico (AB 10 mg/kg) nos níveis plasmáticos de glicose em diferentes tempos no protocolo de teste oral de tolerância à glicose (TOTG).....	50
Figura 13. Efeito do ácido betulínico sobre a hipertrigliceridemia após 24 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.....	51
Figura 14. Efeito do ácido betulínico sobre a hipertrigliceridemia após 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.....	52

Figura 15. Efeito do ácido betulínico sobre a hipercolesterolemia após 24 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.....	54
Figura 16. Efeito do ácido betulínico sobre a hipercolesterolemia após 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.....	55
Figura 17. Efeito do ácido betulínico sobre a peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico-TBARS, após protocolo de dislipidemia induzida pelo triton WR 1339.....	57
Figura 18. Efeito do ácido betulínico sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) após protocolo de dislipidemia induzida pelo triton WR 1339.....	58
Figura 19. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de colesterol total em protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	59
Figura 20. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos em protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	60
Figura 21. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de glicose após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	61
Figura 22. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de uréia após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	62
Figura 23. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de creatinina após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	63
Figura 24. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de AST após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	64
Figura 25. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de ALT após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	65
Figura 26. Consumo de ração dos grupos experimentais após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico em diferentes concentrações.....	69
Figura 27. Consumo de água dos grupos experimentais após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico em diferentes concentrações.....	70
Figura 28. Massa corporal dos grupos experimentais, em gramas, após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico em diferentes concentrações.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos no modelo de diabetes induzida por aloxano.....	49
Tabela 2. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de triglicerídeos após 24 e 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR 1339.....	53
Tabela 3. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de colesterol total após 24 e 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR 1339.....	56
Tabela 4. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos após modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	61
Tabela 5. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmáticas de uréia e creatinina após modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	63
Tabela 6. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmática de AST e ALT após modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	65
Tabela 7. Avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.....	66
Tabela 8. Avaliação das concentrações plasmáticas de AST e ALT após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.....	67
Tabela 9. Avaliação das concentrações plasmáticas de uréia e creatinina após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.....	67
Tabela 10. Avaliação dos parâmetros hematológicos após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	ácido betulínico
AB 5	ácido betulínico 5mg/Kg
AB 10	ácido betulínico 10mg/Kg
AB 20	ácido betulínico 20mg/Kg
ACAT 1	Acil-CoA: colesterol acetiltransferase 1
ACAT 2	Acil-CoA: colesterol acetiltransferase 2
ALT	alanina aminotransaminase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo AI	Apolipoproteína A1
Apo B100	Apolipoproteína B100
Apo C III	Apolipoproteína CIII
AST	aspartato aminotransferase
CEPA	Comitê de ética em pesquisa animal
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
c-HDL	colesterol HDL
CN	controle negativo
CP	Controle positivo
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sódico
EPM	Erro padrão da media
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FENO	Fenofibrato

GLIB	Glibenclamida
GLUT	transportador de glicose
HCM	hemoglobina corpuscular media
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMGCoA redutase	3-hidroxi-3metil-glutaril CoA redutase
IDL	lipoproteínas de densidade intermediária
i.p	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
LCAT	lecitina colesterol acil-transferase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipase lipoproteica
MDA	Malonilaldeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPAR- α	receptores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas- alfa
RDW	red cell distribution width
RE	Resolução Especial
RH	Ração hipercolesterolêmica
RP	Ração padrão
r.p.m	Rotações por minuto
SINV	Sinvastatina
SOD	superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicerídeos
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
Triton WR 1339	Tiloxapol
UFC	Universidade Federal do Ceará

V	Veículo
VCM	volume corpuscular médio
VLDL	lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Produtos Naturais.....	18
1.2 Toxicologia de produtos naturais.....	20
1.3 Terpenos.....	22
1.4 Ácido Betulínico.....	23
1.5 Diabetes <i>mellitus</i>	25
1.6 Dislipidemias e Metabolismo Lipoproteico.....	28
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral.....	35
3.2 Objetivos Específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Obtenção do ácido betulínico.....	36
4.2 Isolamento do ácido betulínico a partir da <i>Clusia nemorosa</i> L.....	36
4.3 Animais.....	37
4.4 Comitê de Ética.....	37
4.5 Efeito do ácido betulínico em modelo experimental de diabetes induzida por aloxano	37
4.6 Efeito do Ácido Betulínico em protocolo experimental de teste oral de tolerância a glicose (TOTG).....	38
4.7 Avaliação do efeito do ácido betulínico no modelo de dislipidemia induzida por Triton WR-1339®.....	39

4.8 Efeito do ácido betulínico sobre a hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	41
4.9 Avaliação da toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias em camundongos.....	43
4.10 Obtenção das amostras e procedimentos analíticos.....	44
4.11 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Protocolo de diabetes induzida por aloxano.....	46
5.2 Protocolo de teste oral de tolerância a glicose.....	49
5.3 Protocolo de dislipidemia induzida pelo triton WR-1339 [®]	50
5.4 Protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.....	58
5.5 Protocolo de avaliação da toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.....	66
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	71
7 CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Produtos naturais são moléculas orgânicas produzidas por tecidos vivos de plantas superiores, fungos, bactérias, organismos marinhos e animais. Eles exibem uma larga diversidade química e propriedades biológicas (FULDA; KROEMER, 2009).

A história da utilização de produtos naturais faz parte da evolução humana, pois foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos. As antigas civilizações têm suas próprias referências a cerca das plantas medicinais e, muito antes do surgimento da escrita, o homem já utilizava as plantas tanto como alimento quanto como medicamento (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

A busca por alívio e cura de doenças utilizando ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de emprego de produtos naturais (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Mesmo com o passar do tempo, nas regiões mais pobres do país, e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais ainda são comercializadas em feiras, mercados populares e cultivadas em residências (MACIEL *et al.*, 2002). Sua aplicação é vasta, abrangendo desde o tratamento de doenças como o câncer até infecções causadas por microorganismos patogênicos (MELO, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 90, em torno de 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso à saúde. Apesar da grande evolução da medicina tradicional, persistem os obstáculos na sua utilização pela população carente, que vão desde a dificuldade no atendimento hospitalar à obtenção de exames e medicamentos. Esses motivos, associados à fácil obtenção e a grande tradição do uso, contribuem para a utilização de plantas para fins medicinais (AGRA *et al.* 2008; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Como o Brasil é um dos países mais ricos do mundo em biodiversidade, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total mundial estimado entre 350.000 a 550.000 (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; MITTERMEIER *et al.*, 2005), ele se torna bastante

promissor no desenvolvimento de novas moléculas devido à sua variedade de animais e plantas.

A biodiversidade ocorre devido à interação entre os organismos vivos e o ambiente, proporcionando a formação de diversas substâncias químicas complexas que contribuem para o aumento de sua competitividade e sobrevivência (MISHRA; TIWARI, 2011). Então, a diversidade biológica é uma importante fonte de substância farmacologicamente ativas, destacando-se, também, pelo seu valor ambiental, portanto, sua preservação é fundamental (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A natureza tem produzido grande parte das substâncias orgânicas conhecidas (SAMY; PUSHPARAJ; GOPALAKRISHNAKONE, 2008; MONTANARI; BOLZANI, 2001) e estudos utilizando plantas são particularmente interessantes, pois elas podem tanto ser usadas na medicina complementar alternativa, quanto podem servir como base para o desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica (SATO *et al.*, 2006).

Desde 1994, vários estudos indicam que aproximadamente 50% das drogas aprovadas para o uso em humanos são provenientes de produtos naturais. Em 2008, mais de uma centena desses compostos estavam em fase de testes clínicos (HARVEY, 2008) e entre os anos de 2005 e 2010, em torno de 19 drogas de origem natural foram aprovadas para comercialização no mercado de diferentes países (MISHRA; TIWARI, 2011).

No entanto, cerca de 90% da população economicamente carente do Nordeste utiliza as plantas medicinais para solucionar seus problemas de saúde, apesar de não ter sua eficácia terapêutica comprovada, baseando-se apenas no conhecimento popular (MATOS, 2002; SILVA *et al.*, 2006).

Assim, é importante a realização de pesquisas envolvendo produtos naturais por diversos motivos. Dentre eles, o fato de que, apesar da grande diversidade vegetal brasileira, o crescimento de pesquisas nessa área é inferior a 10% ao ano. Tal situação dificulta o uso racional das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, dada carência de informações adequadas sobre aspectos como eficácia e segurança desses produtos (MARIZ *et al.*, 2008).

Por isso, a identificação dos componentes ativos, bem como a elucidação de seus mecanismos de ação, são grandes desafios para a química farmacêutica, bioquímica e farmacologia (MACIEL *et al.*, 2002).

A química de produtos naturais tem grande importância, pois pode fornecer substâncias com atividade biológica que dificilmente seriam obtidas por síntese química. Além disso, as moléculas obtidas de fontes naturais podem ser levemente modificadas com o intuito de melhorar sua atividade biológica, bem como podem ser utilizadas como protótipo para a obtenção de fármacos com atividades terapêuticas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Princípios ativos extraídos de plantas, em sua forma isolada, tornam os estudos para a investigação de atividade biológica mais vantajosos, uma vez que a ação encontrada será atribuída a uma única substância em uma concentração determinada, bem como a maior facilidade para o controle de qualidade em relação a produtos com composição complexa e não conhecida completamente (LEITE, 2008; SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2003)

Estudos para determinar a eficácia biológica de fitocompostos específicos provenientes de alimentos e de plantas são realizados através de experimentação *in vitro* e *in vivo*. Eles são realizados a partir de protocolos de cultivo celular e modelos animais que antecedem os estudos em humanos, essa abordagem é adotada pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos medicamentos. No entanto, além da atividade biológica comprovada, é necessário avaliar a segurança por meio de estudos toxicológicos (TRAKA; MITHEN, 2011).

1.2 Toxicologia de produtos naturais

Pesquisas realizadas para avaliar o uso seguro de produtos naturais ainda não são suficientes, assim como o seu controle e comercialização. A toxicidade desses produtos é um problema de saúde pública, uma vez que os efeitos adversos provenientes da sua utilização, bem como o sinergismo com outras drogas, ocorrem comumente (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A maioria dos fitoterápicos que são usados por automedicação ou por prescrição médica, não tem seu perfil toxicológico conhecido. O produto, mesmo com baixa toxicidade, quando usado de forma inadequada, pode resultar em graves problemas de saúde, principalmente, se utilizado de forma excessiva, contra-indicado e/ou em uso concomitante com outros medicamentos (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; VEIGA JUNIOR, 2008).

Além disso, as reações adversas podem ser desencadeadas pela presença de contaminantes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade no cultivo, na coleta e na extração dos constituintes da planta, até a elaboração do medicamento (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Nesse sentido, os produtos naturais são semelhantes à xenobióticos sintéticos, pois a autorização para o seu uso deve ser baseada em evidências experimentais de que seu benefício terapêutico é maior do que o risco inerente ao seu uso (LEITE, 2008; BRASIL, 1995).

Os estudos toxicológicos são realizados visando prever os possíveis efeitos adversos, que podem se manifestar após a exposição humana à determinada substância química, podendo ser um medicamento, um praguicida, um agente químico industrial, dentre outros, utilizando, principalmente, modelos animais para este propósito (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

Segundo a RE nº90 (Resolução Especial) da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os estudos toxicológicos podem ser ensaios de longa duração ou de doses repetidas, podendo ser subdivididos em experimentos de quatro semanas (30 dias de tratamento) e de doze semanas (90 dias de tratamento) (BRASIL, 2004).

Assim, a pesquisa sobre as propriedades química, a farmacologia e a determinação da toxicidade de produtos derivados de plantas é essencial, uma vez que os vegetais contribuem de forma significativa para o fornecimento de substâncias ativas, muitas delas, oriundas do metabolismo secundários das plantas, sendo utilizadas como medicamentos (PINTO *et al.*, 2002). Um importante grupo de metabólitos secundários isolados de plantas

denomina-se terpenos, despertando o interesse em virtude de suas potenciais atividades farmacológicas.

1.3 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de produtos do metabolismo secundário de plantas, sendo classificadas em hemiterpenos (C5), monoterpeno (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (40) de acordo com as unidades pentacarbonadas (TAIZ; ZEIGER, 2009; BERGAMASCHI, 2010).

Os metabólitos secundários são compostos químicos cuja síntese ocorreu como consequência da evolução das espécies vegetais à medida que elas adaptavam-se ao meio ambiente, enquanto que os metabólitos primários estão presentes em todas as plantas (CHEN *et al.*, 2011).

Os terpenos apresentam diversas funções biológicas nas plantas, sendo importantes não apenas para o seu crescimento e desenvolvimento, mas agindo, também, na interação delas com o ambiente. Dessa forma, atuam na atração de polinizadores e na proteção contra predadores herbívoros, bem como na prevenção contra a fotoxidação dos tecidos, exercendo um importante papel na preservação do reino vegetal. Mais de 20.000 diferentes terpenos são conhecidos e possuem uma imensa diversidade estrutural, contribuindo para suas variadas aplicações, tais como em insumos para produtos farmacêuticos e cosméticos, flavorizantes, assim como inseticidas (THOLL, 2006).

O terpeno estudado no presente trabalho pertence ao grupo dos triterpenos, podendo ocorrer tanto na forma livre, quanto na forma de agliconas de saponinas triterpenóides, estando presentes em muitos vegetais, sendo empregados na medicina popular e como alimentos (FRIGHETTO *et al.*, 2005). Atribui-se a essas substâncias diversas atividades biológicas tais como: cardioprotetora (SUDHAHAR *et al.*, 2007), gastroprotetora (PERTINO *et al.*, 2007), antiinflamatória (MEDEIROS *et al.*, 2007), antitumoral (BRAGA *et al.*, 2007) e anti-hiperglicêmica (SATO *et al.*, 2007).

Os principais grupos de triterpenos são representados por derivados tetracíclicos e pentacíclicos. Triterpenos pentacíclicos apresentam um esqueleto com 30 carbonos, configurados em cinco anéis de seis membros (ursanos e lanostanos) ou em quatro anéis de seis membros e um anel de cinco membros (lupanos e hopanos) (CHUNG; NAVARATNAM; CHUNG, 2011). A diversidade estrutural desses metabólitos contribui de forma importante para a diversidade de suas ações biológicas (SPORN *et al.*, 2011).

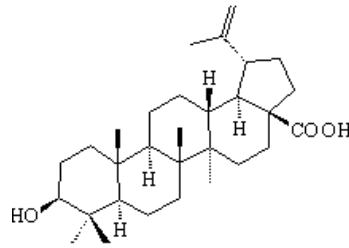
Estudos experimentais com compostos triterpenos pentacíclicos mostraram a inibição de diferentes sistemas enzimáticos estreitamente relacionados com a absorção e com a metabolização de carboidratos e lipídeos, como a lipase e a alfa amilase (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006; YOSHIZUMI *et al.*, 2006), da proteína tirosina fosfatase (ZHANG *et al.*, 2008), da glicogênio fosforilase (WEN *et al.*, 2008), da diacilglicerol acetiltransferase (DGAT) (CHUNG *et al.*, 2006) e da alfa glucosidase (ATTA-UR-RAHMAN *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2009).

1.4 Ácido Betulínico

O ácido betulínico (AB) (Figura 01) é um triterpeno pentacíclico do tipo lupano amplamente distribuído no reino vegetal, presente em frutas e verduras. Suas fontes tradicionais são espécies europeias do gênero *Betula*, que produzem seu álcool precursor, a betulina (FRIGHETTO *et al.*, 2005).

Ele também está presente em inúmeras espécies tropicais, sendo extraído em grandes quantidades da casca de uma variedade de espécies de árvores, dentre elas as do gênero *Clusia* (FRIGHETTO *et al.*, 2005; YOGEE SWARI; SRIRAM, 2005). Esse gênero engloba cerca de 250 espécies que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais das Américas do Sul e Central, apresentando-se na forma de arbustos, cipós, bem como árvores de pequeno, médio e grande porte, chegando até os 20 metros de altura (FARIAS *et al.*, 2011).

Figura 1. Estrutura química do ácido betulínico.



Esse triterpeno apresenta uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas pode-se citar as atividades antimalárica, antiinflamatória, antihelmíntica, antioxidante, anti-HIV, propriedades imunomodulatórias e antineoplásica em diferentes células cancerígenas humanas (YOGEERSWARI; SRIRAM, 2005). Dentre essas atividades, destaca-se o efeito antineoplásico, visto que, apesar da potente citotoxicidade do ácido betulínico contra vários tipos de câncer, ele parece não atuar em células normais (FULDA; KROEMER, 2009; ZUCO *et al.*, 2002).

Além dessas ações, o ácido betulínico vem despontando como uma substância potencialmente útil no tratamento da obesidade, uma vez que inibe a diacilglicerol aciltransferase (DGAT), enzima envolvida na síntese dos triglicerídeos (CHUNG *et al.*, 2006).

Recentemente, pesquisas realizadas pelo nosso grupo do Laboratório de Pesquisa de Bioquímica Clínica em parceria com o Laboratório de Produtos Naturais, da Universidade Federal do Ceará, demonstraram uma diminuição no ganho de massa corpórea e aumento da sensibilidade à insulina em animais obesos. Observou-se ainda, a modulação de diversas enzimas e hormônios envolvidos na absorção e metabolismo dos carboidratos e lipídios (MELO *et al.*, 2009).

Assim, de acordo com o exposto, verifica-se a importância no que diz respeito ao estudo das atividades hipolipidêmica e hipoglicêmica do ácido betulínico.

1.5 Diabetes *mellitus*

Existem relatos de muitos produtos naturais que possuem atividade hipoglicêmica. Nos últimos anos, o uso da medicina alternativa tem aumentado muito, pois cerca de um terço da população diabética dos Estados Unidos trata a doença utilizando tratamentos complementares. Substâncias com diferentes mecanismos redutores de glicose são encontradas nas plantas. Mecanismos estes, muitas vezes, semelhantes ao das classes de hipoglicemiantes orais já conhecidas (SATO *et al.*, 2006).

A Diabetes *mellitus* (DM) é uma das doenças do sistema endócrino mais comuns, acometendo cerca de 4,4% da população (GAO *et al.*, 2009). Segundo Bellahcen *et al.* (2011) a incidência de diabetes tende a crescer em todo o mundo a uma taxa de aproximadamente 3% ao ano, podendo aumentar de 171 milhões em 2000 para 342 milhões de pacientes em 2030 (OJEZELE; ABATAN, 2011).

No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, a diabetes está sendo reconhecida como um importante problema de saúde pública, haja vista que tem ocupado um percentual de 30 a 40% das causas de morbidade entre pessoas adultas (SILVA *et al.*, 2008).

A DM é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente, ou quando o corpo não pode efetivamente utilizá-la, resultando em hiperglicemia. Essa condição pode causar sérios danos aos diversos sistemas do organismo, em especial aos sistemas nervoso e circulatório (ESPINOSA *et al.*, 2011).

A Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM 1) ocorre devido à destruição das células β pancreáticas que são responsáveis pela produção da insulina. Essa destruição é resultado de uma interação de fatores imunológicos, genéticos e ambientais (VAN DEN DRIESSCHE *et al.*, 2009). Suas manifestações clínicas surgem quando cerca de 80% das células beta foram destruídas (GODOI, 2011).

Na diabetes *mellitus* tipo 2 (DM 2), inicialmente, observa-se uma elevação concomitante da resistência a insulina e dos seus níveis séricos, quando o pâncreas não produz mais insulina suficiente para manter o equilíbrio da glicemia, ocorre a hiperglicemia

(SOUSA, 2010). Assim, na DM2 a hiperglicemia ocorre como consequência da ação ineficaz da insulina devido a fatores como o excesso de peso, a inatividade física e a suscetibilidade genética (ESPINOSA *et al.*, 2011).

Estima-se que grande parte dos pacientes com DM2 são obesos. De acordo com Shulman (2000), o excesso de gordura corporal induz a resistência a insulina que pode ocorrer por uma redução no transporte da glicose. Essa redução acontece pelo efeito direto dos ácidos graxos sobre o transportador GLUT 4 e/ou pode resultar de alterações na sinalização da insulina, fazendo com que essa enzima não promova seus efeitos metabólicos (SALA *et al.*, 2011). Esses pacientes representam cerca de 80-90% de todos os casos, sendo uma crescente ameaça à saúde pública (PAPI REDDY *et al.*, 2009).

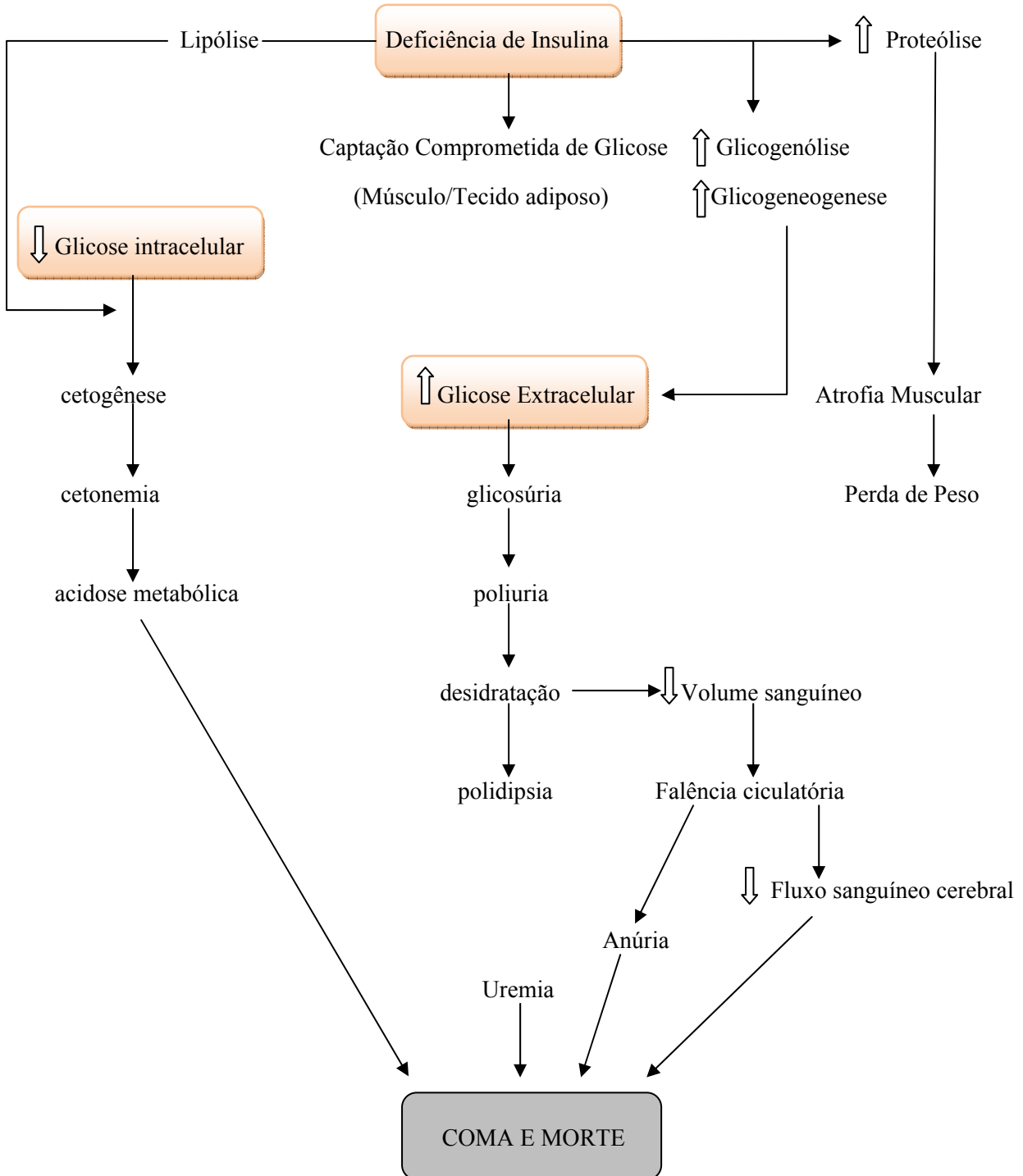
Existe, ainda, outra forma de DM menos frequente, conhecida como diabetes gestacional. Ela ocorre quando surge uma intolerância aos carboidratos, em diferentes graus, durante a gestação, aumentando o risco de complicações para mãe e filho. O diagnóstico é realizado através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG), e alguns estudos sugerem que mulheres que desenvolveram a diabetes gestacional, aumentam o risco do surgimento de DM 2 durante a vida (HORVATH *et al.*, 2010).

A DM é caracterizada pela desregulação no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídeos (BOYLE *et al.*, 2001). Assim, a hiperglicemia e a hiperlipidemia estão envolvidas no desenvolvimento de complicações macro e microvasculares, sendo as principais causas da morbimortalidade relacionada à diabetes (GAO *et al.*, 2009).

Na hiperglicemia, parte da glicose passa a ser eliminada através da urina (glicosúria), e por sua ação osmótica, o volume urinário (poliúria) aumenta, podendo resultar em desidratação e polidipsia. A deficiência na produção ou na atividade da insulina dificulta a utilização da glicose por tecidos insulino-dependentes. Assim, os triacilgliceróis armazenados são utilizados com consequente liberação de ácidos graxos no sangue, tornando-se a principal fonte de energia do organismo, resultando no aumento da produção de corpos cetônicos responsáveis pela acidose metabólica. (CARVALHO, 2007; LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

A evolução da doença sem o controle glicêmico ideal pode acarretar em complicações agudas como a perda de peso, cetoacidose diabética, estado hiperosmolar glicêmico, hipoglicemia e acidose láctica, bem como complicações tardias microvasculares (retinopatia) (GUIDONI, 2009) (Figura 2).

Figura 2. Consequências metabólicas da deficiência ou resistência a insulina



Fonte: (CARVALHO, 2007; DAVIES; BLAKELEY; KIDD 2002).

Observa-se que a diabetes tem sido cada vez mais influenciada pelo estilo de vida e dieta. O seu tratamento envolve mudanças alimentares, aliada ao uso de fármacos redutores da glicose no sangue através de diferentes mecanismos, incluindo o aumento da secreção de insulina e da absorção e metabolização da glicose (ESPINOSA *et al.*, 2011). Os recursos terapêuticos para o controle da diabetes incluem a administração da própria insulina e hipoglicemiantes orais, tais como: sulfoniluréias, biguanidas e inibidores de α -glicosidase, utilizados em monoterapias ou associados.

As sulfoniluréias, por exemplo a glibenclamida, atuam principalmente estimulando a liberação de insulina pelo pâncreas, mas também inibem de forma sutil a formação de glicose a partir de aminoácidos e ácidos graxos no fígado, denominada de gliconeogênese, além de aumentar o número de receptores de insulina nas células-alvo (OJEZELE; ABATAN, 2011).

Entretanto, têm se observado a ocorrência de efeitos adversos oriundos do uso de hipoglicemiantes orais (SY *et al.*, 2005). Tal fato demonstra a importância de pesquisas científicas que visem à descoberta de novas substâncias farmacologicamente ativas obtidas de plantas e que sejam eficazes e seguras, uma vez que a diabetes, além das suas complicações, está bastante relacionada com o surgimento e/ou agravamento de doenças cardiovasculares (DCVs).

1.6 Dislipidemias e Metabolismo Lipoproteico

As DCVs constituem a principal causa de óbito em grande parcela da população adulta, particularmente aquela maior de 30 anos de idade, principalmente nos países ocidentais. Tal posição tem sido mantida, apesar de, nas últimas décadas, ter ocorrido um declínio acentuado da mortalidade por essas doenças nos países desenvolvidos (CARDOSO *et al.*, 2011).

No entanto, nos países em desenvolvimento, ocorreu um rápido aumento da mortalidade por DCVs nos últimos 30 anos. De acordo com as projeções da OMS, essa elevação tende a persistir, agravando a morbimortalidade desses países (SBC, 2007). Em relação ao Brasil, a prevalência das DCVs varia de acordo com as regiões. Nos estados do Sul

e Sudeste, por exemplo, observou-se um maior percentual de óbitos por motivos cardiovasculares, sendo de 33,5% e 34,9%, respectivamente (CARDOSO *et al.*, 2011)

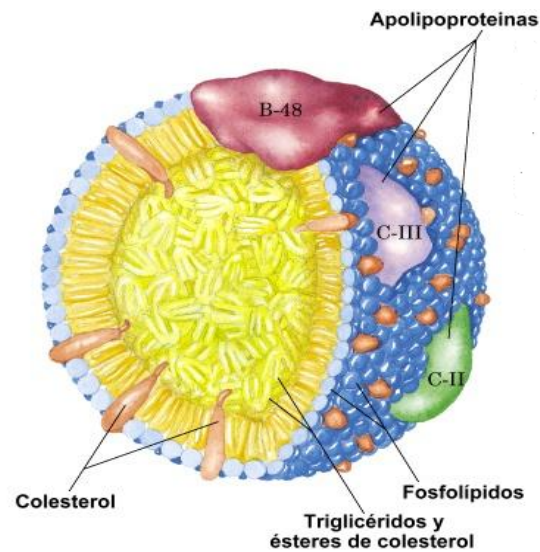
As dislipidemias, também, são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, isoladamente ou associada a outros fatores como a diabetes e a obesidade. Elas ocorrem em consequência de modificações no metabolismo lipídico que promovem uma alteração na concentração das lipoproteínas no sangue (KOLANKIEWICZ; GIOVELLI; BELLINASSO, 2008).

As dislipidemias podem ser classificadas em primárias ou secundárias de acordo com a sua etiologia. As primárias ocorrem em decorrência de fatores genéticos, enquanto que as secundárias podem desenvolver-se a partir de doenças pré-existentes, como a diabetes, após a utilização de determinados medicamentos, assim como devido aos hábitos inadequados, tais como dieta rica em gorduras, tabagismo e alcoolismo (ROCHA, 2009).

Os níveis sanguíneos de triglicérides e do colesterol estão bastante relacionados com o desenvolvimento das dislipidemias. Esses lipídeos também apresentam funções importante para o organismo, uma vez que os triglicéridos são importantes fontes de energia, enquanto que o colesterol é um componente essencial para a membrana celular e um precursor de hormônios esteróides e ácidos biliares (SHUKLA *et al.*, 2011).

Os lipídios, por serem substâncias hidrofóbicas, são transportados pela circulação sanguínea na forma de macromoléculas denominadas de lipoproteínas (Figura 3). As lipoproteínas são complexos solúveis de lipídeos e proteínas (apolipoproteínas), sintetizadas no fígado ou intestino, que atuam como principal veículo de transporte de colesterol intra e extravascular (LUND-KATZ; PHILLIPS, 2010).

Figura 3. Estrutura das lipoproteínas



Fonte: (NELSON; COX, 2006).

As lipoproteínas tem sua estrutura composta por um núcleo hidrofóbico rico em triglicéridos e ésteres de colesterol, envolvido por uma camada hidrofílica de colesterol livre, fosfolípidos e proteínas chamadas de apolipoproteína (SILVA, 2011). As apolipoproteínas permitem a interação da lipoproteína com receptores de diferentes tecidos, atuando também como cofatores de enzimas que agem sobre o conteúdo lipídico lipoproteico, sendo importantes para a homeostase do colesterol plasmático (OLIVEIRA, 2009).

Existem cinco classes principais de lipoproteínas que diferem em tamanho, forma, densidade, composição, função e na sua contribuição para DCVs (DANIELS *et al.*, 2009). São classificadas como quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (PITANGA, 2001).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lipídeos oriundos da dieta, enquanto que a VLDL é formada inicialmente no fígado, contendo altas concentrações de triglicéridos e moderadas concentrações de fosfolípidos e colesterol, estando associadas à progressão da aterosclerose. À medida que circula no sangue, a VLDL é metabolizada pela enzima lipase lipoproteica (LPL), responsável por catalisar a hidrólise dos triglicéridos (principalmente VLDL e quilomícrons), liberando ácidos graxos não esterificados que podem ser depositado no tecido adiposo ou ser utilizado como fonte de energia (SILVA, 2011; DANIELS *et al.*, 2009; PITANGA, 2001).

A atividade da LPL é regulada por fatores como os níveis de ácidos graxos não esterificados, apolipoproteínas e hormônios (PAGLIALUNGA *et al.*, 2009). A ação dessa enzima ocasiona uma diminuição do conteúdo de triglicerídeos da VLDL, tornando-a mais densa, passando a ser denominada de IDL. Parte dessas partículas retornam ao fígado, e as que permanecem no sangue, continuam sofrendo a ação da LPL, dando origem as partículas de LDL (SILVA, 2011; DANIELS *et al.*, 2009; SPOSITO *et al.*, 2007).

As LDL são constituídas por quantidade reduzida de triglicerídeo, mas uma percentagem muito alta de colesterol, que está associado às alterações nas paredes internas das artérias. A apolipoproteína presente na LDL é a Apo B100 que possui sítios de reconhecimento para os receptores de LDL encontrados em praticamente todas as células do metabolismo (SILVA, 2011; DANIELS *et al.*, 2009; PITANGA, 2001)..

A HDL é composta por cerca de 50% de proteínas e pequenas concentrações de lipídios, cuja principal função é transportar o colesterol dos tecidos e da corrente sanguínea em direção ao fígado, onde pode ser convertido em ácidos biliares e excretado, tal processo é conhecido como transporte reverso. Por isso, os níveis plasmáticos de HDL são inversamente associados às doenças coronarianas (SILVA, 2011; DANIELS *et al.*, 2009; PITANGA, 2001).

Dentre as enzimas envolvidas no transporte reverso do HDL está a lecitina colesterol acil-transferase (LCAT). Essa enzima é sintetizada no fígado e ao chegar na circulação associa-se às lipoproteínas e lipídios livres, catalisando a reação de esterificação do colesterol. O colesterol esterificado é apolar, sendo internalizado na molécula de HDL. Dessa forma, a ação da LCAT é mais favorável na HDL uma vez que essa lipoproteína é rica em Apo A1, um ótimo cofator para essa enzima. Estudos em humanos sugeriram que mutações na Apo A1 podem produzir efeitos na aceleração da aterosclerose (DANIELS *et al.*, 2009; BORGGREVE; VRIES; DULLAART, 2003).

A elevação anormal dos níveis de colesterol é denominada de hipercolesterolemia sendo, atualmente, um problema de saúde pública por está envolvida na gênese da aterosclerose. Além disso, altos níveis plasmáticos de colesterol estão relacionadas a doença coronariana e disfunção endotelial, podendo promover uma lesão tecidual isquêmica e,

consequentemente, aumentando a vulnerabilidade à aterogênese (SUDHAHAR *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2000)

A aterosclerose pode ser definida como uma doença multifatorial na qual o acúmulo de LDL na parede vascular é responsável pela maior parte dos casos de acidente vascular, aneurisma e infarto do miocárdio e cerebral (GONÇALVES *et al.*, 2000). Ela é considerada uma doença degenerativa e de progressão lenta, apresentando sintomas decorrentes de interferências mecânicas no fluxo sanguíneo (CARDOSO *et al.*, 2011). Isso ocorre, pois ao longo dos anos, os lipídeos vão depositando-se na forma de gordura na pele e nas artérias, formam xantomas e ateromas, respectivamente (GONÇALVES *et al.*, 2000).

Quando o acúmulo de placas de gordura nos vasos aumenta ao ponto de impedir o fluxo sanguíneo, ocorre obstrução arterial (GONÇALVES *et al.*, 2000). Evidências mostram que as dislipidemias e o estresse oxidativo apresentam mecanismos relacionados ao desenvolvimento da aterosclerose e doenças cardiovasculares (RIZZO *et al.*, 2009).

Dessa forma, estresse oxidativo pode ser definido como uma condição na qual o sistema antioxidante é ineficiente para neutralizar os radicais livres, ocorrendo devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e /ou diminuição dos mecanismos antioxidantes. Os radicais livres podem ser formados por fontes exógenas como o tabaco, poluição do ar, anestésicos, e radiações, bem como fontes endógenas (MONTEIRO, 2011).

A geração de EROS, em baixas quantidades, produz efeitos fisiológicos benéficos. Entretanto, em quantidades elevadas, sua influência pode ser prejudicial para várias biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em alterações estruturais e funcionais, podendo causar morte celular por necrose ou apoptose (RIZZO *et al.*, 2009).

A modificação oxidativa dos lipídeos associados à LDL está diretamente envolvida na iniciação do processo aterosclerótico, uma vez que as alterações resultam da exposição dessa lipoproteína a vários agentes oxidantes, tais como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, enzimas como lipoxigenase e produtos da mieloperoxidase. Essa

situação agrava-se com a diminuição dos componentes antioxidantes, com posterior oxidação dos lipídeos e proteínas da LDL (MELLO *et al.*, 2011; RIZZO *et al.*, 2009).

Assim, o contínuo aumento dos níveis de lipídios pode causar problemas de saúde devido ao aumento do estresse oxidativo que se agrava pela falta de atividade física (SHUKLA *et al.*, 2011). Dessa forma, o tratamento desse desequilíbrio metabólico compreende controle da dieta, exercícios físicos bem como o uso de drogas redutoras de lipídeos (XIE *et al.*, 2007).

As estatinas e os fibratos são considerados as estratégias terapêuticas eficientes para o tratamento de dislipidemias. As estatinas, como a sinvastatina, são inibidoras competitivas da HMG CoA redutase, que catalisa a reação limitante na biossíntese do colesterol. No entanto, após sua utilização prolongada, podem ocorrer efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade, podendo resultar na interrupção do seu uso (SIKKA *et al.*, 2011).

Os fibratos são medicamentos bastante utilizados no tratamento da hipertrigliceridemia, tendo uma ação importante no controle das dislipidemias mistas. Eles atuam estimulando os receptores nucleares ativados de proliferação dos peroxissomas- alfa, conhecidos como PPAR- α , levando ao aumento da produção da LPL e redução da Apo C III. Esses mecanismos estimulam a lipólise dos triglicerídeos presentes nos quilomícrons e na VLDL, bem como o aumento da beta oxidação dos ácidos graxos no fígado (XAVIER, 2005).

Diante disso, o uso crônico desses fármacos pode causar mialgia e rabdomiólise, sendo necessários estudos para o desenvolvimento de moléculas oriundas de produtos naturais mais seguras e com menos efeitos colaterais (SHUKLA *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Levando-se em consideração as limitações impostas pelas opções terapêuticas disponíveis, seja pelo alto custo ou pela presença de efeitos colaterais, as pesquisas de novos agentes redutores de lipídeos e fármacos hipoglicemiantes oriundos de plantas medicinais se justificam e tem sido conduzidas pela comunidade científica (MELO *et al.*, 2009).

Assim, a descoberta de uma substância de origem natural como recurso terapêutico para o tratamento de fatores de risco envolvidos no desencadeamento de doenças cardiovasculares, como o diabetes e as dislipidemias poderá contribuir para a melhoria da qualidade de vida, uma vez que se verifica uma boa aceitação de produtos de origem natural, por parte da população, além de, muitas vezes, ser menos dispendioso para o Sistema Único de Saúde.

Neste cenário, encontram-se os terpenos, uma classe de metabólitos secundários que constitui um dos maiores grupos de compostos oriundos de produtos naturais, possuindo várias substâncias de relevância clínica (ROHDICH *et al.*, 2002).

Dessa forma, o ácido betulínico apresenta-se como uma possível ferramenta farmacológica para o tratamento de dislipidemias e diabetes *mellitus*, podendo contribuir para uma melhor qualidade de vida da população acometida por tais doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o possível efeito hipolipidêmico, hipoglicêmico e modulador do estresse oxidativo do ácido betulínico em protocolos experimentais de dislipidemias e diabetes induzidas farmacologicamente bem como estudar seu potencial tóxico *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação hipoglicêmica do ácido betulínico em animais com diabetes induzida por aloxano;
- Analisar a atividade hipoglicêmica do ácido betulínico em protocolo de Teste Oral de Tolerância a Glicose (TOTG);
- Verificar a atividade hipolipidêmica do ácido betulínico em animais com dislipidemia induzida por Triton WR-1339[®];
- Avaliar a atividade antioxidante do ácido betulínico através dos níveis de TBARS e SOD, após protocolo de dislipidemia induzida pelo Triton WR-1339[®];
- Estudar o efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos bem como verificar a função renal e hepática de animais com hipercolesterolemia induzida por dieta modificada;
- Verificar o potencial tóxico do ácido betulínico em protocolo de toxicidade oral de doses repetidas por 28 dias em camundongos através da determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos;
- Analisar o efeito do ácido betulínico sobre a massa corporal e o consumo de ração e água dos animais durante a realização dos protocolos de toxicidade oral em doses repetidas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do ácido betulínico

O ácido betulínico foi isolado e identificado pela Professora Doutora Otilia Deusdênia L. Pessoa do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará a partir da raiz de *Clusia nemorosa* L.(*Clusiaceae*) que foi coletada na localidade Pico Alto, município de Guaramiranga-Ceará.

4.2 Isolamento do ácido betulínico a partir da *Clusia nemorosa* L.

4.2.1 Preparação do extrato etanólico

O extrato etanólico foi preparado a partir de 3800g das raízes secas e trituradas de *C. nemorosa* que foram desengorduradas com *n*-hexano e depois foram submetidas à extração com álcool etílico a temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada e, em seguida, concentrada sob pressão reduzida fornecendo 87,71g de extrato etanólico.

4.2.2 Fracionamento cromatográfico do extrato etanólico

O extrato etanólico (87,71g) foi submetido a um fracionamento cromatográfico utilizando os solventes CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. A fração CH₂Cl₂ 100% foi recromatografada como descrito abaixo.

4.2.3 Fracionamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂

A fração CH₂Cl₂ (4,0g) foi recromatografada em um modo de eluição gradiente utilizando os solventes CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade. A fração eluída com CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) forneceu 900mg de ácido betulínico.

4.3 Animais

Para a execução de todos os protocolos experimentais que serão descritos utilizou-se camundongos *swiss* (25-30g), albinos e machos oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará. Esses animais permaneceram acondicionados em gaiolas apropriadas e foram mantidos sob temperatura média de $22^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Antes do início dos protocolos experimentais os animais foram aclimatizados no laboratório durante 7 dias.

4.4 Comitê de Ética

É importante ressaltar que todos os protocolos experimentais realizados atenderam aos preceitos éticos nacionais e internacionais referentes à pesquisa com animais. De acordo com as normas exigidas, o referido projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará com número de protocolo 03/2011.

4.5 Efeito do ácido betulínico em modelo experimental de diabetes induzida por aloxano.

O aloxano foi utilizado neste protocolo por ser um composto citotóxico descrito na literatura para indução de diabetes em animais. Sua ação diabetogênica ocorre pela inibição da secreção de insulina devido à destruição seletiva das células beta pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001).

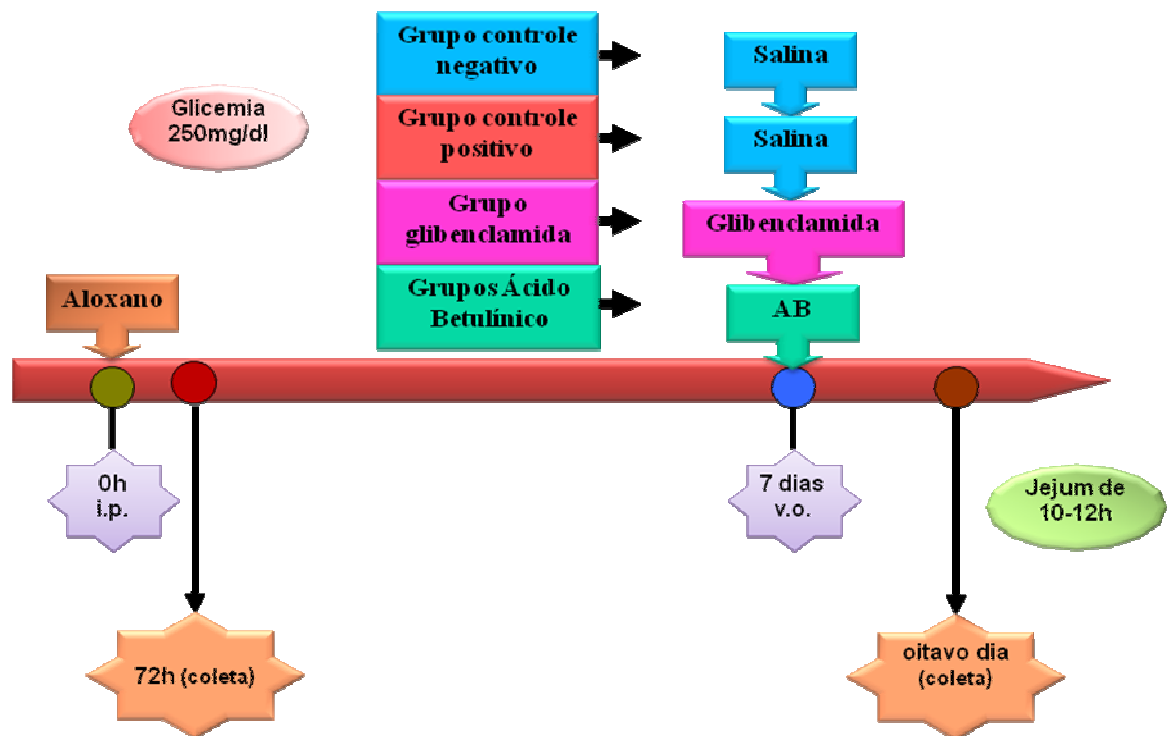
Para a realização do protocolo de diabetes induzida pelo aloxano, os camundongos foram mantidos em jejum de sólidos por 18h e, em seguida, receberam uma injeção intraperitoneal de aloxano (200mg/kg). Após 72h, os animais foram submetidos a um novo jejum alimentar de 6-8h e posteriormente realizou-se uma coleta de sangue para avaliar os níveis glicêmicos dos animais. Os animais que apresentaram uma glicemia maior ou igual a 250mg/dL (QI *et al.*, 2008) foram considerados diabéticos.

Os animais diabéticos foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos (n=8): controle negativo (CN), controle positivo (CP), glibenclamida 20mg/kg (GLIB), ácido

betulínico 5mg/Kg (AB 5), ácido betulínico 10mg/Kg (AB 10) e ácido betulínico 20mg/Kg (AB 20). O tratamento foi realizado uma vez ao dia durante 7 dias, por via oral, por meio da técnica de gavagem. Os grupos controle negativo e positivo foram tratados com salina, o grupo GLIB recebeu glibenclamida 20 mg/Kg e nos grupos AB 5, AB 10 e AB 20 administrou-se ácido betulínico nas doses de 5, 10 e 20 mg/Kg, respectivamente.

Após o período de tratamento, os animais foram submetidos a uma coleta de sangue pelo plexo orbital mediante jejum alimentar de 6-8h para determinação plasmática dos parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total e triglicerídeos (Figura 4).

Figura 4. Esquema do protocolo experimental de indução da diabetes pelo aloxano



Fonte: modificado de Ferreira (2010).

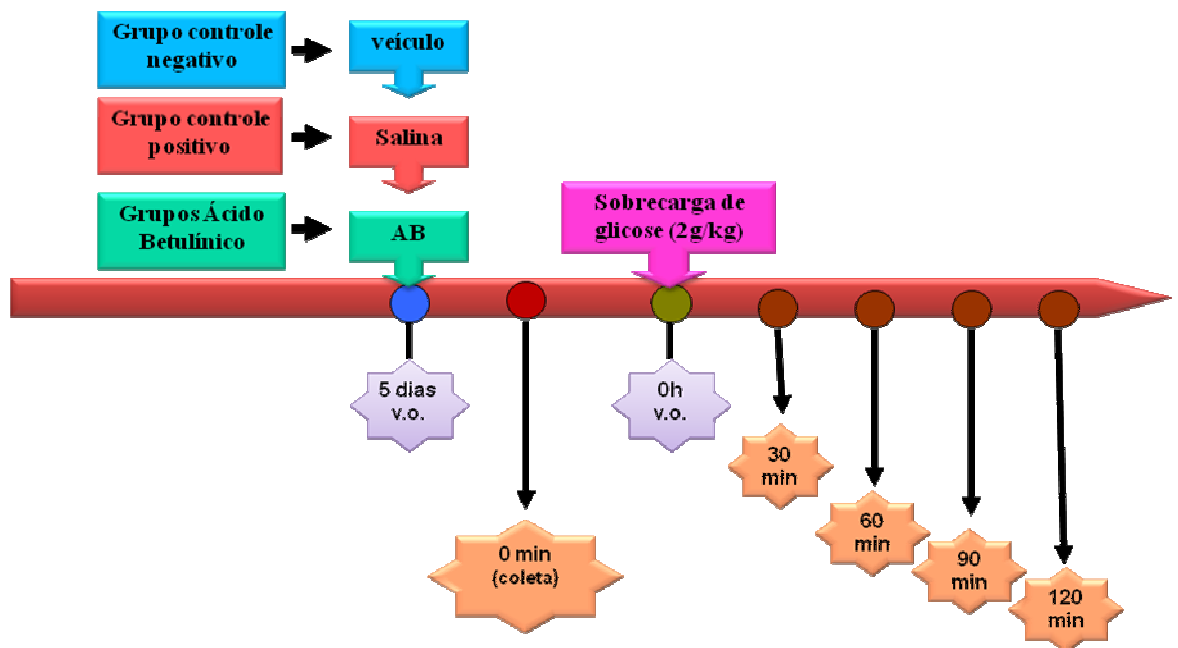
4.6 Efeito do Ácido Betulínico em protocolo experimental de teste oral de tolerância a glicose (TOTG)

Os camundongos foram divididos nos grupos (n=8): controle negativo (CN), controle positivo (CP) e ácido betulínico 10mg/Kg (AB 10), sendo esses previamente tratados por 5 dias consecutivos. O pré-tratamento dos grupos foi realizado da seguinte forma: o controle negativo foi tratado com veículo (2% Tween 80 em água) e não recebeu sobrecarga de glicose. Nos grupos controle positivo e AB 10 administrou-se salina e ácido betulínico na

dose de 10 mg/Kg, respectivamente e, depois, foi realizada a sobrecarga de glicose em ambos os grupos.

Após 2 horas do último pré-tratamento e, após, 6-8 horas de jejum foi realizada a primeira coleta sanguínea para determinação de glicose que foi denominada de tempo zero. Em seguida, os grupos AB10 e controle positivo receberam uma sobrecarga de glicose via oral (2g/kg). Após 30, 60, 90 e 120 minutos, foram realizadas novas coletas para avaliar a variação dos níveis plasmáticos de glicose (Figura 5) (MELO *et al.*, 2010).

Figura 5. Esquema do protocolo experimental do teste oral de tolerância a glicose (TOTG)



Fonte: modificado de Ferreira (2010).

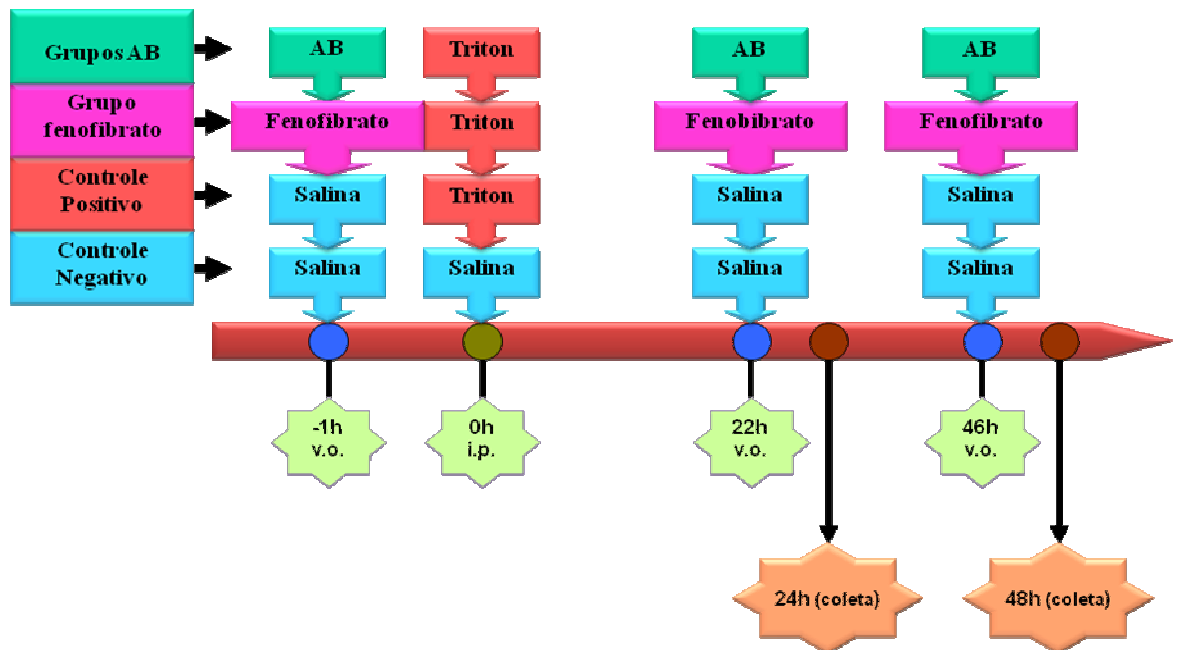
4.7 Avaliação do efeito do ácido betulínico no modelo de dislipidemia induzida por Triton WR-1339[®]

Para o estudo da dislipidemia induzida por triton WR-1339[®], os camundongos foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n=8): controle negativo (CN), controle positivo (CP), fenobibrato 200mg/kg (FENO), ácido betulínico 5mg/Kg (AB 5), ácido betulínico 10mg/Kg (AB 10) e ácido betulínico 20 mg/Kg (AB 20). A dislipidemia foi induzida em todos os grupos por uma única administração intraperitoneal (i.p.) de triton WR-1339 na dose de 400mg/kg (HALL *et al.*, 2000), exceto no grupo controle negativo. Os grupos controle negativo e positivo foram tratados com salina, o grupo FENO recebeu

fenofibrato 200mg/Kg e nos grupos AB 5, AB 10 e AB 20 administrou-se ácido betulínico nas concentrações de 5, 10 e 20mg/Kg, respectivamente (Figura 6). Os animais foram tratados, por via oral, pela técnica de gavagem, sendo esses tratamentos realizados 1h antes, 22h e 46h após a administração intraperitoneal de triton.

Após 24h e 48h da indução da dislipidemia, os animais foram submetidos a uma coleta de sangue pelo plexo orbital mediante jejum de sólidos prévio de 6-8 horas, para determinação plasmática dos parâmetros bioquímicos colesterol total e triglicerídeos.

Figura 6. Esquema do protocolo experimental de indução de dislipidemia pelo triton WR-1339[®]



Fonte: modificado de Ferreira (2010).

4.7.1 Avaliação da atividade antioxidante do ácido betulínico após a realização do modelo de dislipidemia induzida por triton WR 1339[®]

Ao final do experimento de dislipidemia induzida por triton, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e uma parte do fígado foi removida, pesada, identificada e conservada a -70°C. Para a determinação da atividade antioxidante, o fígado foi homogeneizado em uma solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15M em uma proporção de 1:10.

a) Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Retirou-se 250 µL do homogenato, em seguida foram adicionados 1,5 mL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1% e 500µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Colocou-se em banho fervente (95-100 C) por 45 minutos. A mistura foi resfriada em água corrente e, em seguida, foi adicionado 2 mL de n-butanol, o tubo foi homogeneizado por 1 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1200rpm/15min. Após a centrifugação foi retirada a fase orgânica para realização da leitura em espectrofotômetro (520-535 nm). Os resultados foram expressos em micromols de malonildialdeído (MDA) por mg de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

b) Determinação da atividade da enzima superóxido desmutase (SOD)

Foi adicionado em tubos de ensaio, 1mL do meio reacional, em seguida, colocou-se 30µL das amostras de homogenato e de tampão no tubo padrão e, sendo dessa forma, levados para a câmara fria. Posteriormente, os tubos foram mantidos em um ambiente com baixíssima luminosidade, onde acrescentou-se 300 µL de riboflavina (1 µM) e homogeneizou-se as amostras. Depois, adicionou-se 150 µL de NBT (750 µM) e as amostras foram novamente homogeneizadas e expostas à luz fluorescente durante 15 minutos. Imediatamente depois, foi feita a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 560 nm (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

4.8 Efeito do ácido betulínico sobre a hipercolesterolemia induzida por dieta modificada

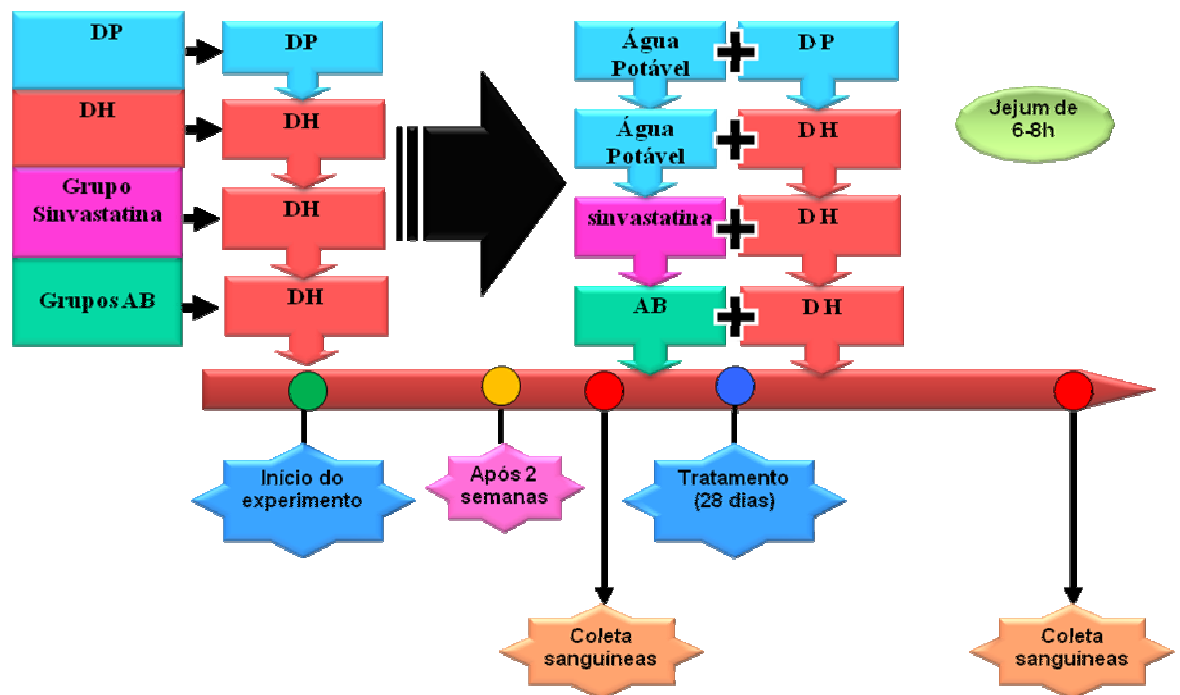
Os camundongos foram divididos nos grupos (n=6): controle negativo (ração padrão), controle positivo (ração modificada), sinvastatina 20mg/kg (SIN), ácido betulínico 5mg/kg (AB 5), ácido betulínico 10mg/kg (AB 10) e ácido betulínico 20mg/kg (AB 20).

Para o aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total, todos os animais, exceto os do grupo controle negativo, foram alimentados durante duas semanas com a ração hipercolesterolêmica. A ração possuía a seguinte composição: colesterol 1% + ácido cólico 0,1% + óleo de *Cocus nucifera* 10% + ração padrão 88,9% (WILSON *et al.*, 2007).

A verificação do quadro de hipercolesterolemia foi feita mediante coleta de sangue do plexo orbital com jejum alimentar prévio de 6-8horas, para determinação dos níveis plasmáticos de colesterol total. Após a identificação da indução da hipercolesterolemia, os animais foram tratados, por via oral, pela técnica de gavagem, durante 28 dias (Figura 7). Os grupos controle negativo e positivo foram tratados com salina, o grupo SIN recebeu sinvastatina 20mg/kg e nos grupos AB 5, AB 10 e AB 20 administrou-se ácido betulínico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente.

Ao final do tratamento, uma nova coleta de sangue pelo plexo orbital foi realizada para a determinação de parâmetros bioquímicos glicose, colesterol total, triglicerídeos, AST, ALT, uréia e creatinina, mediante jejum alimentar prévio de 6 a 8h.

Figura 7. Esquema do protocolo experimental de indução de hipercolesterolemia por dieta modificada



Fonte: modificado de Ferreira (2010).

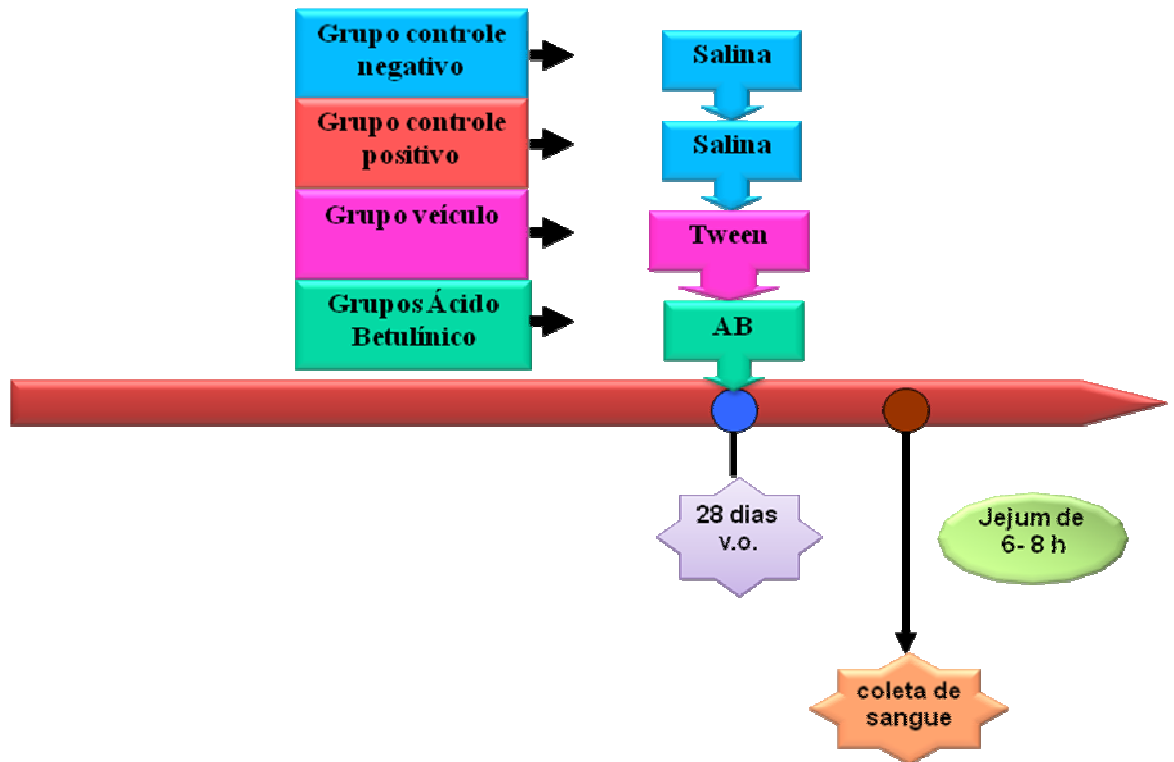
4.9 Avaliação da toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias em camundongos

Para a avaliação toxicológica, os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (n=10): controle negativo (CN), veículo (Tween 80) e ácido betulínico 5mg/kg (AB 5), ácido betulínico 10mg/kg (AB 10) e ácido betulínico 20mg/kg (AB 20).

Os animais foram tratados, por via oral, pela técnica de gavagem, durante 28 dias. Os grupos controle negativo e positivo foram tratados com salina, o grupo veículo recebeu tween 80 e nos grupos AB 5, AB 10 e AB 20 administrou-se ácido betulínico nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/kg, respectivamente (Figura 8).

Após o período de tratamento de 28 dias, foi realizada uma coleta de sangue através do plexo orbital. Na coleta, foram utilizados dois tipos de anticoagulantes, a heparina sódica para a determinação dos parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol total, triglicerídeos, uréia, creatinina, AST e ALT) e o EDTA para a realização dos parâmetros hematológicos. Também foram confeccionados esfregaços sanguíneos, isentos de anticoagulante, para posterior contagem diferencial dos leucócitos. Além da determinação dos parâmetros laboratoriais, foi realizado o acompanhamento semanal da evolução da massa corpórea e ingestão de alimentos e água dos animais.

Figura 8. Esquema do protocolo experimental para avaliação da toxicidade oral de doses repetidas durante 28 dias



Fonte: modificado de Ferreira (2010).

4.10 Obtenção das amostras e procedimentos analíticos

Antes das coletas de sangue, os camundongos foram submetidos a jejum alimentar de 6-8 horas e as amostras foram colhidas em microtubos do tipo Ependorf[®] contendo 20 μ L do anticoagulante heparina sódica 1:10 em soro fisiológico para a determinação dos parâmetros bioquímicos. Em seguida, para a obtenção do plasma, as amostras ficaram em repouso entre 30 minutos e 2 horas antes da centrifugação que foi realizada durante 15 minutos a 3500rpm. Os parâmetros bioquímicos foram realizados através de técnicas enzimáticas e/ou colorimétricas utilizando kits específicos e seguindo as recomendações do fabricante Labtest[®] com o auxílio de equipamento semi-automático (Labquest[®]).

Para a realização do hemograma, as amostras foram colhidas em microtubos contendo 20 μ L de EDTA (10g/dL) e foram mantidas sob homogeneização até a análise em equipamento de hematologia semi-automático. Após a análise, foram obtidos e avaliados o número de hemácias, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito e dos índices hematimétricos VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), contagem global e diferencial dos

leucócitos e número de plaquetas. Os esfregaços foram confeccionados com amostra sem anticoagulante e corados com a técnica panótica rápida. Posteriormente, foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos obtendo-se o percentual de neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

4.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão médio (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Newman-Keuls ou Bonferroni adotando-se como critério de significância o $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0.

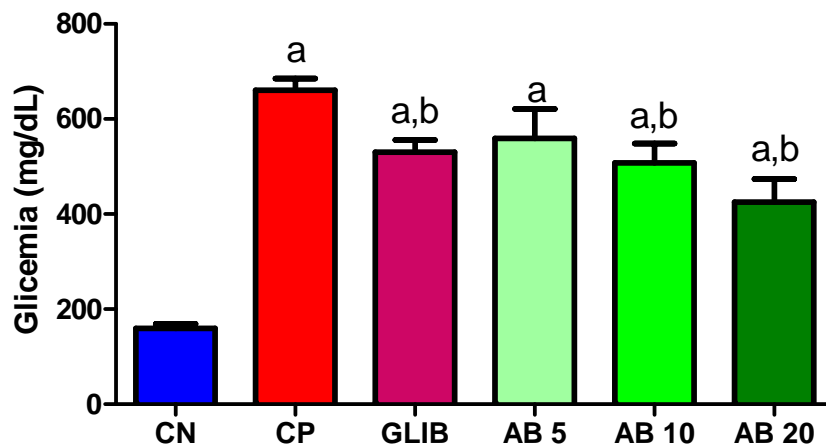
5 RESULTADOS

5.1 Protocolo de diabetes induzida por aloxano

5.1.1 Efeito do ácido betulínico nos níveis plasmáticos de glicose após indução da diabetes pelo aloxano

O aloxano induziu uma hiperglicemia estatisticamente significante entre os grupos CN ($159,90 \pm 29,12\text{mg/dL}$) e CP ($660,00 \pm 80,00\text{mg/dL}$) correspondendo a um aumento de 312,7% no grupo CP. Os grupos AB10 ($507,7 \pm 127,6\text{mg/dL}$) e AB20 ($425,00 \pm 154,30\text{mg/dL}$) apresentaram reduções significativas nos níveis plasmáticos de glicose em 23,0% e 35,6%, respectivamente, em relação ao grupo CP ($660,00 \pm 80,00\text{mg/dL}$). No entanto, grupo AB5 ($555,00 \pm 175,90 \text{mg/dL}$) não reduziu esse parâmetro (Figura 9 e Tabela 1).

Figura 9. Efeito do ácido betulínico sobre a hiperglicemia induzida por aloxano após tratamento de 7 dias.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

GLIB: Glibenclamida 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

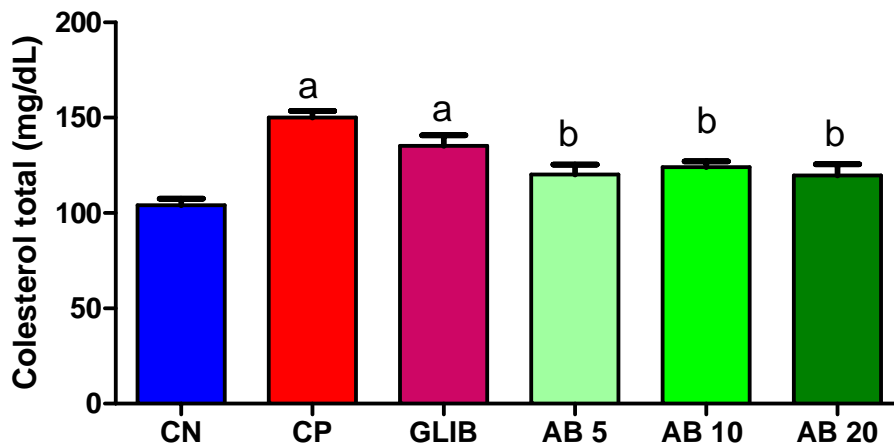
AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.1.2 Efeito do ácido betulínico nos níveis plasmáticos de colesterol total após indução da diabetes pelo aloxano

Quanto ao colesterol total, o aloxano foi capaz de aumentar esse parâmetro de forma significativa em 44,2% comparando-se o grupo CN ($104,00 \pm 11,48\text{mg/dL}$) ao grupo CP ($150,00 \pm 11,27\text{mg/dL}$). Verificou-se que os grupos AB5 ($120,60 \pm 16,01\text{mg/dL}$), AB10 ($124,00 \pm 9,78\text{mg/dL}$) e AB20 ($119,70 \pm 18,66\text{mg/dL}$) reduziram este parâmetro de forma significativa (Figura 10 e Tabela 1).

Figura 10. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de colesterol total no modelo de diabetes induzida por aloxano após tratamento de 7 dias.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

GLIB: Glibenclamida 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

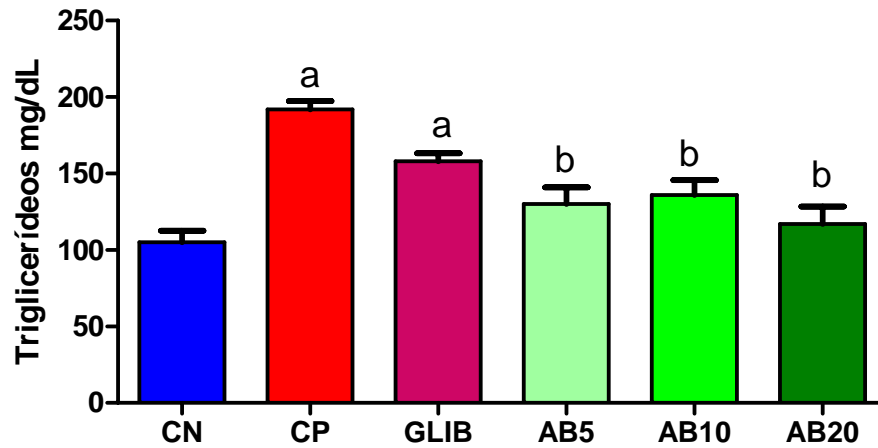
AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, a: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; b: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.1.3 Efeito do ácido betulínico nos níveis plasmáticos dos triglicerídeos após indução da diabetes pelo aloxano

A injeção intraperitoneal de aloxano aumentou em 82,8% os triglicerídeos (TG) plasmáticos quando comparado o grupo CP ($192,00 \pm 17,02\text{mg/dL}$) ao grupo CN ($105,00 \pm 24,31\text{mg/dL}$) ($p < 0,05$). Os grupos AB 5 ($130,00 \pm 34,36\text{mg/dL}$), AB 10 ($136,00 \pm$

30,67mg/dL) e AB 20 ($117,00 \pm 36,49$ mg/dL) foram capazes de reduzir esse parâmetro quando comparados ao CP ($192 \pm 17,02$ mg/dL) (Figura 11 e Tabela 1).

Figura 11. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de triglicerídeos no modelo de diabetes induzida por aloxano após tratamento de 7 dias.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

GLIB: Glibenclamida 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Tabela 1. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos no modelo de diabetes induzida por aloxano.

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Glicose (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
CN	159,90 ± 29,12	104,00 ± 11,48	105,00±24,31
CP	660,00 ± 80,00 ^a	150,00 ± 11,27 ^a	192,00 ± 17,02 ^a
GLIB	530,00 ± 80,92 ^{a,b}	135,30 ± 17,45 ^a	158,00 ± 16,79 ^a
AB 5	559,00 ± 175,90 ^a	120,30 ± 16,01 ^b	130,00 ± 34,36 ^b
AB 10	507,70 ± 127,60 ^{a,b}	124,00 ± 9,78 ^b	136,00 ± 30,67 ^b
AB 20	425,00 ± 154,30 ^{a,b}	119,70 ± 18,66 ^b	117,00 ± 36,49 ^b

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

GLIB: Glibenclamida 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

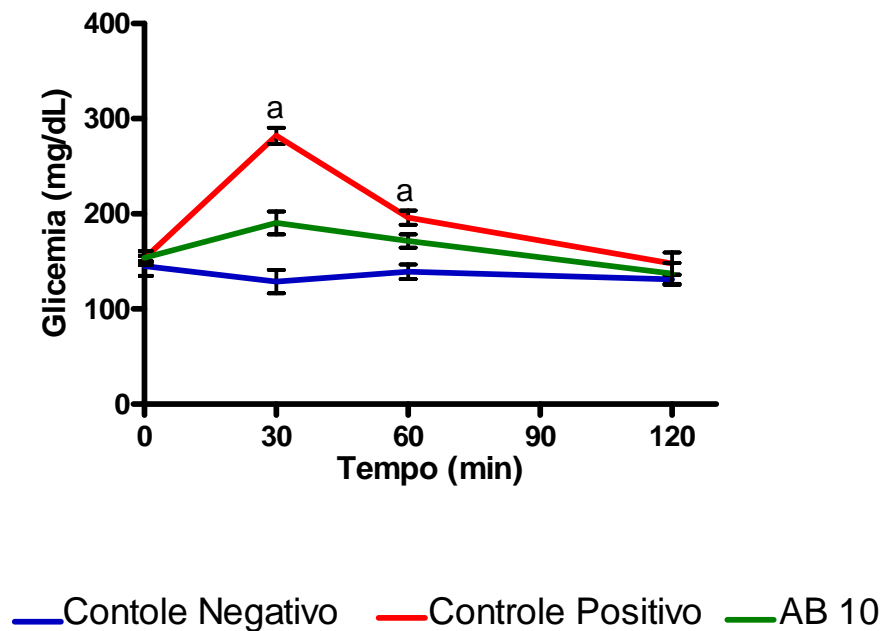
AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: p<0,05 em relação ao grupo CN; **b**: p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.2 Protocolo de teste oral de tolerância a glicose

Observou-se, neste protocolo, que no tempo zero os grupos não apresentaram diferença significativa nos níveis glicêmicos. Após 30 (190,00 ± 29,27 mg/dL) e 60 (171,00 ± 16,99 mg/dL) minutos da sobrecarga de glicose (2g/kg), o grupo pré-tratado com ácido betulínico 10mg/kg teve sua hiperglicemia reduzida de forma significativa quando comparado ao controle positivo (285,00 ± 21,00 mg/dL). Nos tempos 90 e 120 minutos, os grupos novamente não apresentaram diferença estatística entre eles (Figura 12).

Figura 12. Efeito do ácido betulínico (AB 10 mg/kg) nos níveis plasmáticos de glicose em diferentes tempos no protocolo de teste oral de tolerância à glicose (TOTG).



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que (—) = animais pré- tratados com veículo (Tween 80) e que não receberam glicose oral (Controle Negativo); (—) = animais que receberam salina e a sobrecarga de glicose oral (Controle Positivo); (—) = animais que foram pré-tratados com AB (10 mg/kg) e que receberam a sobrecarga de glicose oral (AB 10), a: $p < 0,05$ em relação ao grupo AB 10 (ANOVA- Neuman Keuls).

5.3 Protocolo de dislipidemia induzida pelo triton WR-1339[®]

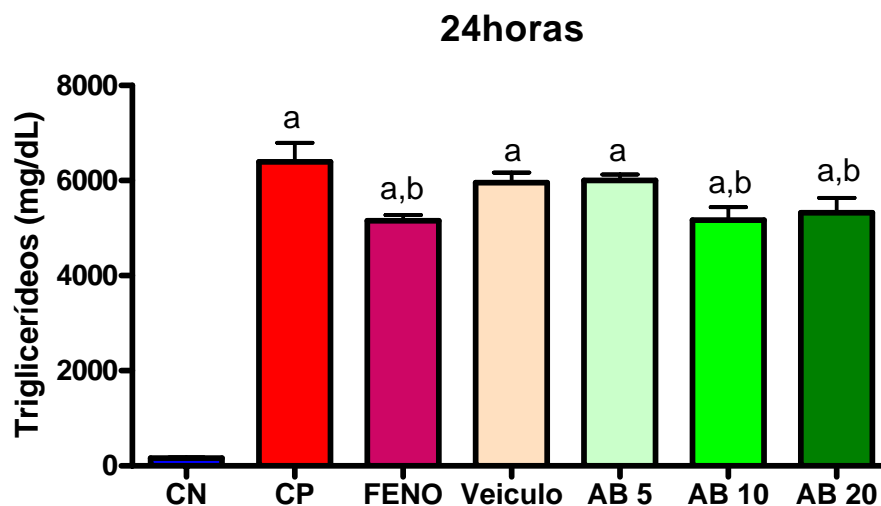
O modelo de indução da dislipidemia pelo Triton WR-1339[®] foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos tanto dos triglicerídeos quanto do colesterol total, visto que, após a indução, observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos Controle negativo (CN) ($163,70 \pm 11,92$ mg/Kg) e Controle positivo (CP) ($6395,00 \pm 401,50$ mg/dL) em ambos os parâmetros (Figuras 6 e 8).

5.3.1 Efeito do ácido betulínico nos níveis plasmáticos de triglicerídeos após indução com triton WR-1339[®]

Os triglicerídeos dos animais do grupo CP, tiveram seus níveis aumentados em 3806,30% em relação ao CN. Na coleta de 24 horas após a indução, o ácido betulínico na dose de 5mg/Kg (AB 5) não diminuiu de forma significativa esse parâmetro. Os camundongos tratados com as doses de 10 e 20 mg/Kg (AB 10 e AB 20) ($5172,00 \pm 273,10$ mg/dL e

5321,00 ± 314,00 mg/dL, respectivamente), tiveram seus níveis plasmáticos reduzidos de forma significativa e semelhante a droga de referência (FENO) (5159,00 ± 115,90 mg/dL) quando comparados ao CP (6395,00 ± 401,50 mg/dL). Em termos percentuais a redução promovida pelo AB 10 e AB 20 foi de 19,10 e 16,80%, respectivamente (Figura 13 e Tabela 2).

Figura 13. Efeito do ácido betulínico sobre a hipertrigliceridemia após 24 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: Fenofibrato 20mg/kg;

Veículo: Tween 80;

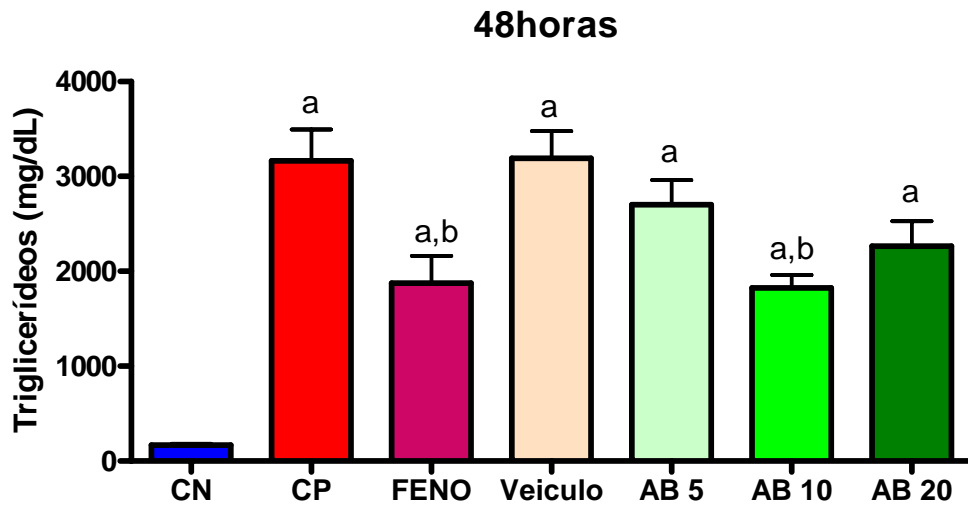
AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: p<0,05 em relação ao grupo CN; **b**: p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Após 48 horas da injeção intraperitoneal de triton, os grupos CN (169,20 ± 14,12 mg/dL) e CP (3165,00 ± 330,00 mg/dL) ainda apresentavam diferença significativa (p<0.05) dos triglicérides plasmáticos. No entanto, apenas os grupos fenofibrato (1874,00 ± 287,10 mg/dL) e AB 10 (1826,00 ± 136,70 mg/dL) mantiveram a redução (p<0,05) deste parâmetro em 40,79 e 42,3%, respectivamente (Figura 14 e Tabela 2).

Figura 14. Efeito do ácido betulínico sobre a hipertrigliceridemia após 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: Fenofibrato 20mg/kg;

Veículo: Tween 80;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Tabela 2. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de triglicerídeos após 24 e 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR 1339.

Parâmetros Bioquímicos		
Grupos	Triglicerídeos-24h	Triglicerídeos-48h
Experimentais	(mg/dL)	(mg/dL)
CN	163,70 ± 11,92	169,20 ± 14,12
CP	6395,00 ± 401,50 ^a	3165,00 ± 330,00 ^a
FENO	5159,00 ± 115,90 ^{a,b}	1874,00 ± 287,10 ^{a,b}
Veículo	5958,00 ± 213,50 ^a	3192,00 ± 286,80 ^a
AB 5	6004,00 ± 123,30 ^a	2702,00 ± 258,60 ^a
AB 10	5172,00 ± 273,10 ^{a,b}	1826,00 ± 136,70 ^{a,b}
AB 20	5321,00 ± 314,00 ^{a,b}	2264,00 ± 263,00 ^a

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) foram expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: Fenofibrato 20mg/kg;

Veículo: Tween 80;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

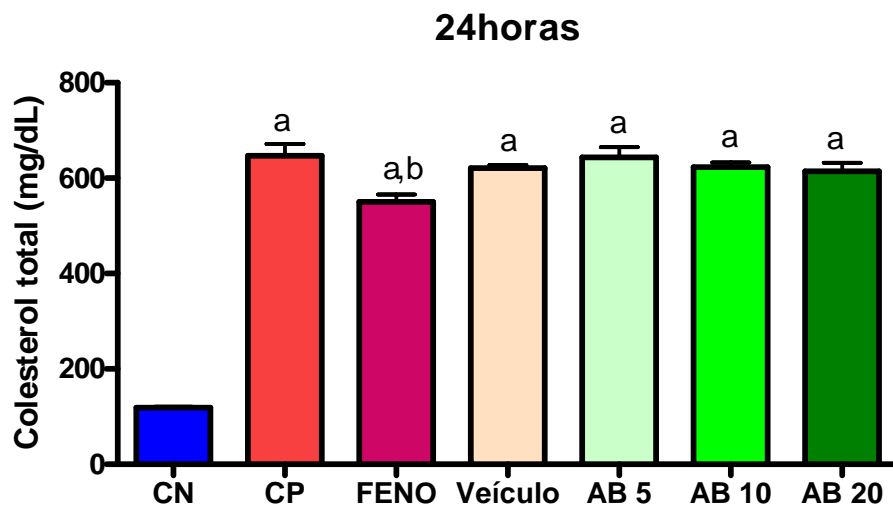
AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: p<0,05 em relação ao grupo CN; **b**: p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.3.2 Efeito do ácido betulínico nos níveis plasmáticos de colesterol total após indução da dislipidemia pelo Triton WR-1339

O colesterol total, também, teve seus níveis aumentados 24 horas após a indução pelo triton WR-1339[®], uma vez que os grupos CN (118,80 ± 2,33 mg/dL) e CP (647,20 ± 24,50 mg/dL) apresentaram uma diferença significativa (p<0.05), representando uma elevação de 444,8% no CP. Não foram observadas reduções do colesterol total plasmático dos grupos tratados com ácido betulínico. Apenas o grupo que foi administrado o fenofibrato (550,00 ± 15,81 mg/dL) apresentou uma diminuição significativa desse parâmetro (Figura 15 e Tabela 3).

Figura 15. Efeito do ácido betulínico sobre a hipercolesterolemia após 24 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: Fenofibrato 20mg/kg;

Veículo: Tween 80;

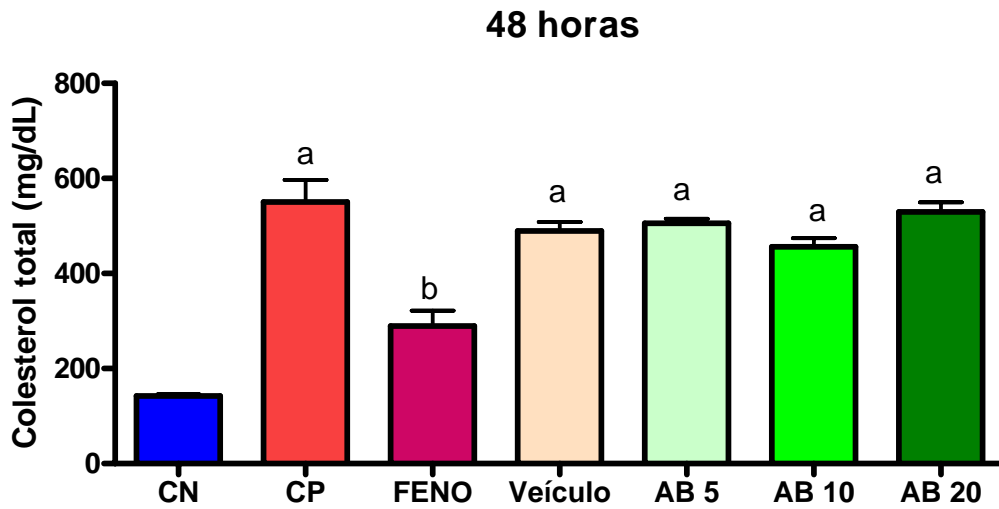
AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a:** $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b:** $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Na coleta após 48 horas da indução da dislipidemia, a diferença estatística do colesterol total sanguíneo entre os grupos CN ($142,20 \pm 3,27$ mg/dL) e CP ($550,00 \pm 46,79$ mg/dL) permaneceu. A diferença deste parâmetro entre o grupo CP e os grupos tratados com ácido betulínico (AB 5, AB 10 e AB 20) não foi significativa. O fenofibrato ($289,70 \pm 32,01$ mg/dL) manteve uma redução significativa dos níveis plasmáticos de colesterol quando comparado ao grupo CP ($550,00 \pm 46,79$ mg/dL) (Figura 16 e Tabela 3).

Figura 16. Efeito do ácido betulínico sobre a hipercolesterolemia após 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR1339.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: fenofibrato 20mg/kg;

Veículo: tween 80;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Tabela 3. Efeito do ácido betulínico sobre a concentração plasmática de colesterol total após 24 e 48 horas da indução da dislipidemia pelo triton WR 1339.

Parâmetros Bioquímicos		
Grupos Experimentais	Colesterol total 24h(mg/dL)	Colesterol total 48h(mg/dL)
CN	118,80 ± 2,33	142,20 ± 3,27
CP	647,20 ± 24,50 ^a	550,00 ± 46,79 ^a
FENO	550,00 ± 15,81 ^{a,b}	289,70 ± 32,01 ^b
Veículo	620,70 ± 7,30 ^a	489,80 ± 18,17 ^a
AB 5	643,50 ± 21,77 ^a	505,50 ± 9,68 ^a
AB 10	632,30 ± 9,70 ^a	456,00 ± 18,02 ^a
AB 20	614,20 ± 18,28 ^a	529,50 ± 20,26 ^a

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: fenofibrato 20mg/kg;

Veículo: tween 80;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a:** p<0,05 em relação ao grupo CN; **b:** p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

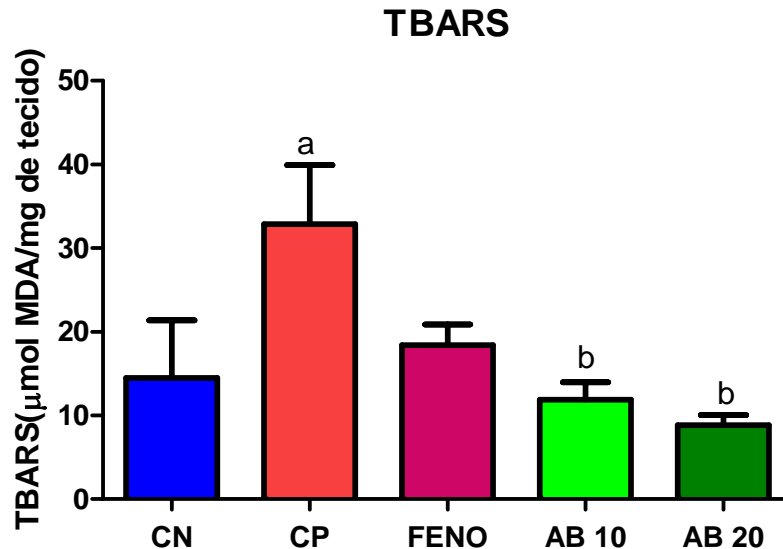
5.3.3 Avaliação da atividade antioxidante do ácido betulínico após protocolo de dislipidemia induzida pelo Triton WR-1339[®]

Após a última coleta, os animais foram sacrificados e parte do seu fígado foi retirada para a avaliação da atividade antioxidante. Avaliou-se o efeito do ácido betulínico sobre a peroxidação lipídica hepática induzida pelo triton através da mensuração das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico – TBARS.

Os níveis de TBARS foram expressos pela concentração de malondialdeído (MDA) que é um dos produtos da peroxidação lipídica. Na Figura 17, verifica-se que a indução da dislipidemia provocou um aumento de 168,70% do TBARS, quando comparados os grupos CN (14,47 ± 6,86) e CP (38,88 ± 7,09).

O ácido betulínico nas doses de 10 (AB 10) ($11,88 \pm 2,07$) e de 20 mg/Kg (AB 20) ($8,819 \pm 1,21$) reduziram significativamente a formação de MDA quando comparados ao CP ($38,88 \pm 7,09$). Sendo esta redução de 69,40% e 77,30% respectivamente (Figura 17).

Figura 17. Efeito do ácido betulínico sobre a peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico-TBARS, após protocolo de dislipidemia induzida pelo triton WR 1339.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

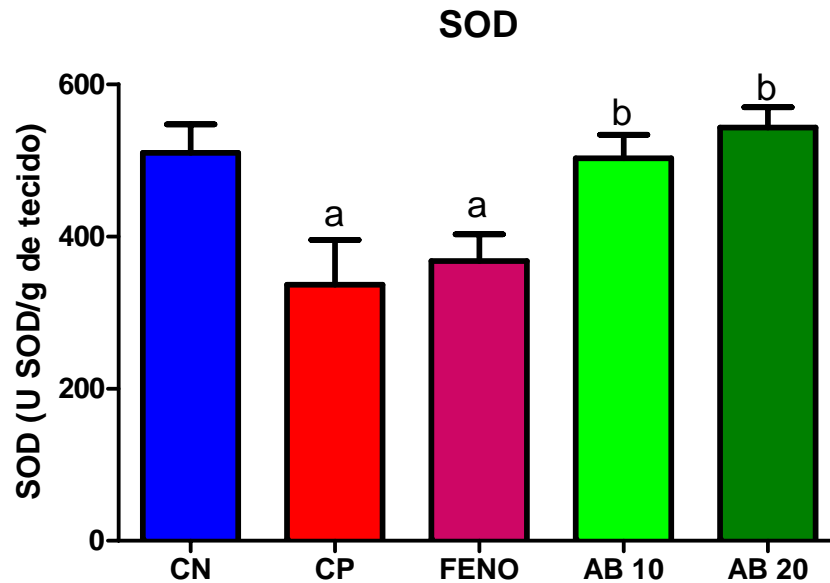
FENO: fenofibrato 20mg/kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Outro parâmetro realizado para avaliar a atividade antioxidante do ácido betulínico, foi a dosagem da enzima superóxido dismutase (SOD). A indução da dislipidemia pelo triton promoveu uma diminuição dos níveis de SOD no CP ($336,40 \pm 58,88$ U/g de tecido) em relação ao CN ($509,70 \pm 37,64$ U/g de tecido). O fenofibrato não alterou a atividade dessa enzima, enquanto que os animais tratados com ácido betulínico nas doses de 10 e 20mg/Kg (AB 10 e AB 20) ($502,6 \pm 30,61$ e $543,1 \pm 30,97$ U/g de tecido, respectivamente), apresentaram um aumento significativo da atividade da SOD quando comparados ao CP ($336,4 \pm 69,66$ U/g de tecido) (Figura 18).

Figura 18. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) após protocolo de dislipidemia induzida pelo triton WR 1339.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

FENO: fenofibrato 20mg/kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

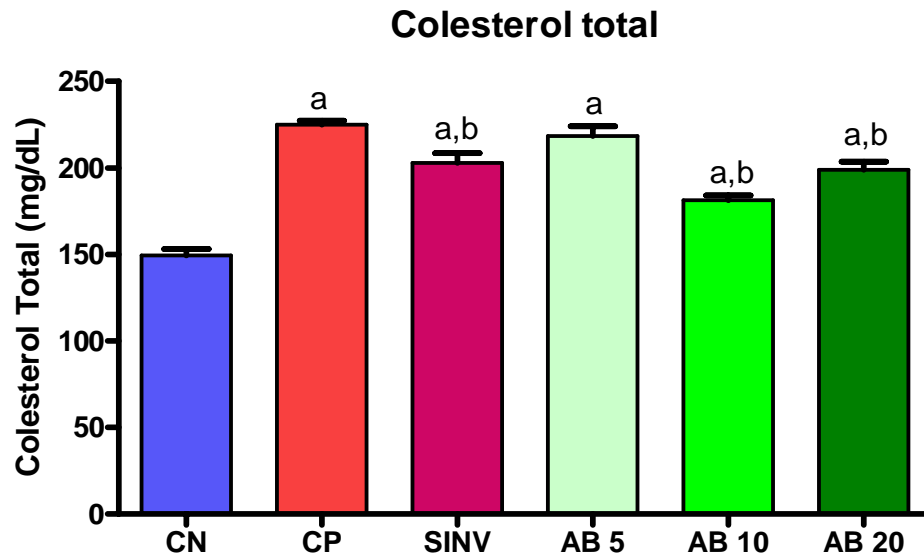
AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.4 Protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada

5.4.1 Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e glicose em protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada

A hipercolesterolemia foi induzida pela ração rica em colesterol, uma vez que a diferença entre os grupos CN ($149,40 \pm 3,60$ mg/dL) e CP ($225,00 \pm 2,24$ mg/dL) foi significativa ($p < 0,05$), correspondendo a um aumento de 50,60% do colesterol total plasmático do CP. Na Figura 19 e na Tabela 4, observa-se que os animais que foram tratados com ácido betulínico nas doses de 10 (AB 10) ($118,40 \pm 2,63$ mg/dL) e 20 mg/Kg (AB 20) ($198,90 \pm 4,81$ mg/dL) tiveram seus níveis de colesterol total reduzidos ($p < 0,05$), em 47,4% e 11,6%, respectivamente, quando comparados ao grupo CP ($225,00 \pm 2,24$ mg/dL).

Figura 19. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de colesterol total após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: Sinvastatina 20mg/kg;

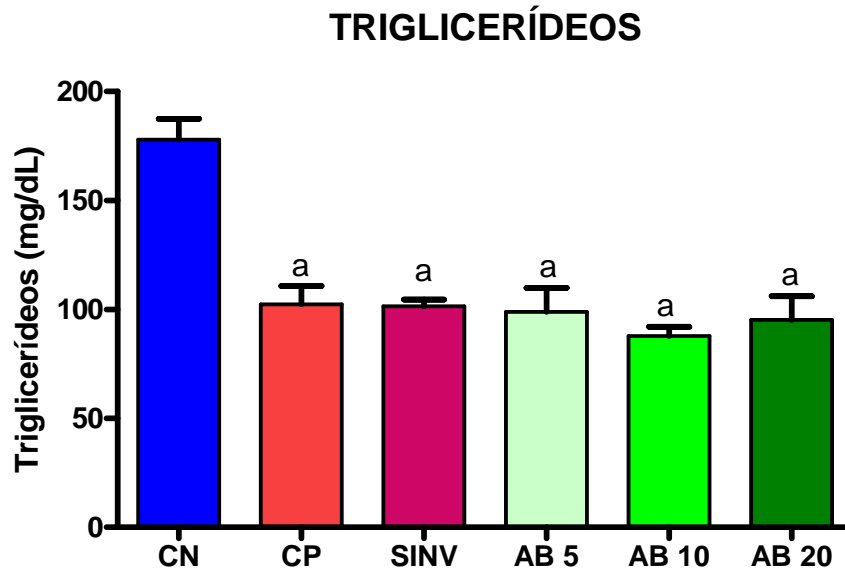
AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Além do colesterol total, foram avaliados outros parâmetros bioquímicos para verificar se a referida ração é capaz de alterá-los. Dentre estes, encontram-se os triglicerídeos que apresentaram uma redução de 42,50% ($p < 0,05$) no grupo CP ($102,30 \pm 8,41$ mg/dL) em relação ao grupo CN ($177,80 \pm 9,57$ mg/dL). Assim como o grupo CP, os demais grupos também sofreram uma diminuição da concentração dos triglicerídeos plasmáticos quando comparados ao CN (Figura 20 e Tabela 4).

Figura 20. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de triglicerídeos após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: sinvastatina 20mg/kg;

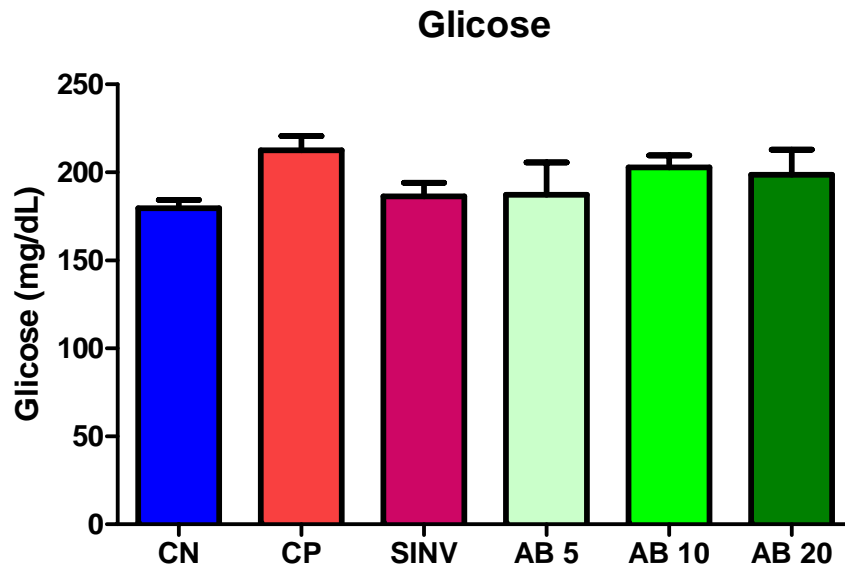
AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

A dieta modificada não alterou os níveis plasmáticos de glicose dos animais já que não houve um aumento significativo da glicemia do grupo CP ($212,50 \pm 8,12$ mg/dL) quando comparada a do grupo CN ($179,70 \pm 4,69$ mg/dL). Na Figura 21 e na Tabela 4, verifica-se que os demais grupos estudados também não apresentaram diferença estatística.

Figura 21. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de glicose após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



CN: controle negativo;
 CP: controle positivo;
 SINV: sinvastatina 20mg/kg.

Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA- Neuman Keuls).

Tabela 4. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos após modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)	Glicose (mg/dL)
CP	149,40 \pm 3,60	177,80 \pm 9,57	179,70 \pm 4,69
CN	225,00 \pm 2,24 ^a	102,30 \pm 8,41 ^a	212,50 \pm 8,12
SINV	202,90 \pm 5,57 ^{a,b}	101,50 \pm 3,05 ^a	186,30 \pm 7,64
AB 5	218,40 \pm 5,50 ^a	98,83 \pm 11,12 ^a	187,20 \pm 18,44
AB 10	118,40 \pm 2,63 ^{a,b}	87,83 \pm 4,17 ^a	202,70 \pm 6,878
AB 20	198,90 \pm 4,81 ^{a,b}	95,17 \pm 10,89 ^a	198,50 \pm 14,36

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: sinvastatina 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

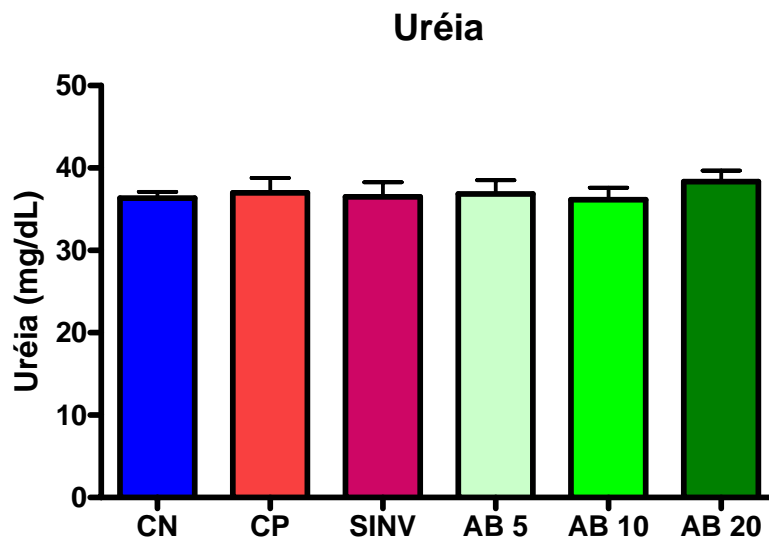
AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a:** $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b:** $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.4.2 Efeito do ácido betulínico sobre as funções hepática e renal em protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada

Os parâmetros relacionados à função renal também foram analisados. Os grupos experimentais não apresentaram diferença estatística nos níveis plasmáticos de uréia (Figura 22 e Tabela 5) e creatinina (Figura 23 e Tabela 5). Dessa forma, a razão hipercolesterolêmica e o tratamento com o ácido betulínico não alteraram tais parâmetros renais.

Figura 22. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de uréia em protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

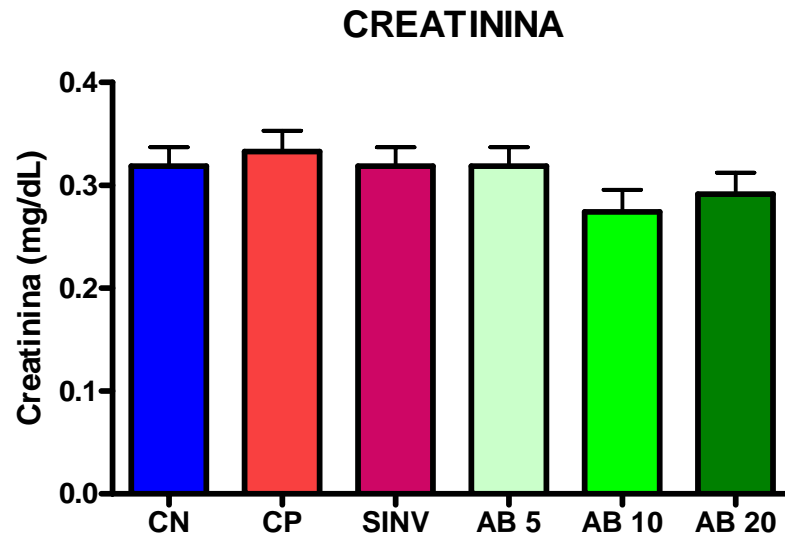
SINV: sinvastatina 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b**: $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Figura 23. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de creatinina em protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: sinvastatina 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a:** p<0,05 em relação ao grupo CN; **b:** p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Tabela 5. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmáticas de uréia e creatinina após modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.

Parâmetros Bioquímicos		
Grupos experimentais	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle negativo	36,33 ± 0,76	0,31 ± 0,01
Controle positivo	37,00 ± 1,80	0,33 ± 0,02
Sinvastatina	36,50 ± 1,76	0,31 ± 0,01
AB 5	36,83± 1,70	0,31 ± 0,01
AB 10	36,17 ± 1,42	0,27 ± 0,02
AB 20	38,33 ± 1,35	0,29 ± 0,02

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: sinvastatina 20mg/kg;

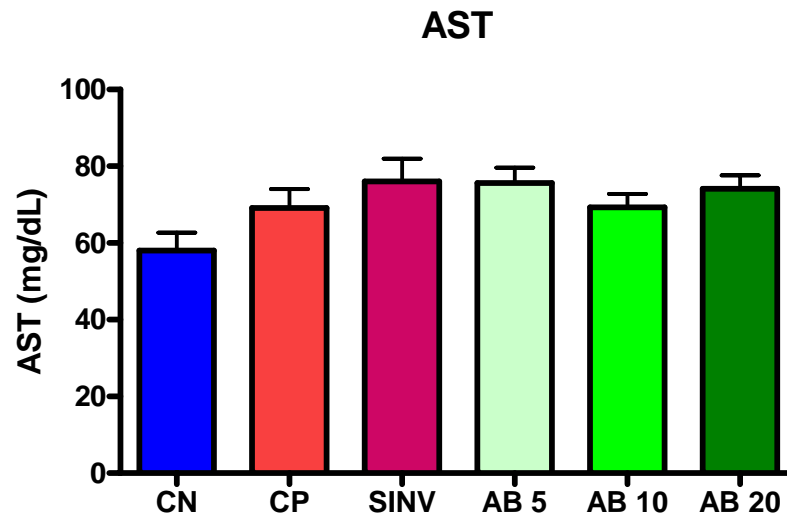
AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a:** p<0,05 em relação ao grupo CN; **b:** p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Parâmetros que avaliam a função hepática também foram mensurados. E os resultados mostraram que tanto a ração modificada quanto o tratamento com o ácido betulínico não modificaram as concentrações plasmáticas de AST (Figura 24 e Tabela 6) e ALT (Figura 25 e Tabela 6).

Figura 24. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de AST após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

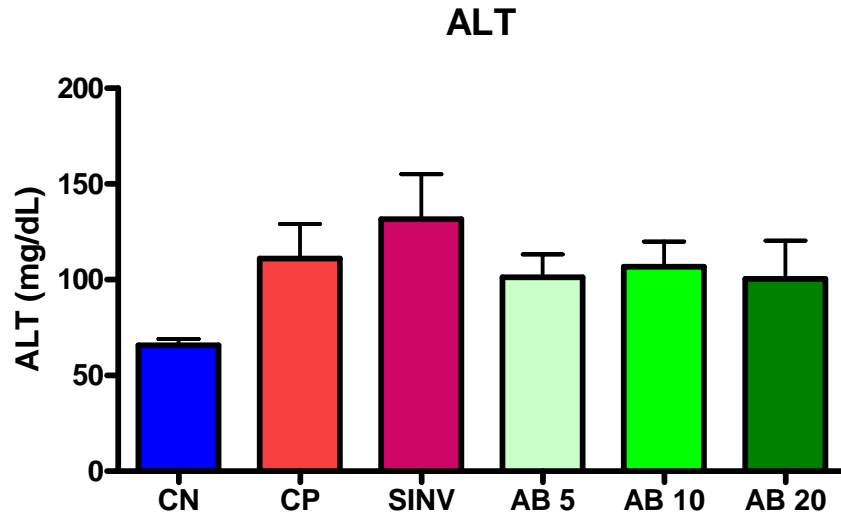
SINV: sinvastatina 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a:** $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; **b:** $p < 0,05$ em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Figura 25. Efeito do ácido betulínico sobre os níveis plasmáticos de ALT após protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: sinvastatina 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: p<0,05 em relação ao grupo CN; **b**: p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

Tabela 6. Efeito do ácido betulínico sobre as concentrações plasmática de AST e ALT após modelo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada.

Parâmetros Bioquímicos		
Grupos experimentais	AST (mg/dL)	ALT (mg/dL)
CN	58,00 ± 4,69	63,75 ± 3,36
CP	69,13 ± 4,95	111,10 ± 17,92
SINV	76,00 ± 5,99	131,60 ± 23,43
AB 5	75,63 ± 4,03	101,30 ± 11,98
AB 10	69,25 ± 3,55	106,80 ± 13,17
AB 20	74,13 ± 3,53	100,40 ± 20,09

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que

CN: controle negativo;

CP: controle positivo;

SINV: sinvastatina 20mg/kg;

AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;

AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;

AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, **a**: p<0,05 em relação ao grupo CN; **b**: p<0,05 em relação ao grupo CP (ANOVA- Neuman Keuls).

5.5 Protocolo de avaliação da toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias

5.5.1 Avaliação dos níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos após protocolo de toxicidade oral em doses repetidas

As determinações bioquímicas realizadas após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico, demonstraram que tal triterpeno não desencadeou alterações significativas das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos (Tabela 7).

Tabela 7. Avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total e triglicerídeos após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.

Grupos experimentais	Parâmetros Bioquímicos		
	Glicose (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
CN	123,90 ± 8,50	129,90 ± 4,03	142,90 ± 19,48
Veículo	119,50 ± 10,53	134,80 ± 3,83	174,50 ± 12,66
AB 5	130,60 ± 10,50	127,50 ± 6,43	163,30 ± 7,959
AB 10	135,30 ± 13,99	134,50 ± 7,24	198,30 ± 20,90
AB 20	141,30 ± 9,30	146,80 ± 4,96	159,90 ± 15,18

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que CN: controle negativo; Veículo: tween 80; AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg; AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg; AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, a: p<0,05 em relação ao grupo CN (ANOVA- Bonferroni).

5.5.2 Avaliação dos níveis plasmáticos de AST, ALT, uréia e creatinina após protocolo de toxicidade oral em doses repetidas

O tratamento com o ácido betulínico e com o veículo por 28 dias, provavelmente, não induz a hepatotoxicidade, visto que não alterou significativamente os parâmetros AST e ALT nas doses utilizadas (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação das concentrações plasmáticas de AST e ALT após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.

Parâmetros Bioquímicos		
Grupos experimentais	AST (mg/dL)	ALT (mg/dL)
CN	80,50 ± 3,98	50,50 ± 1,76
Veículo	76,00 ± 3,75	56,25 ± 1,92
AB 5	82,50 ± 4,14	59,25 ± 3,90
AB 10	79,88 ± 4,11	55,88 ± 2,04
AB 20	88,13 ± 3,43	55,88 ± 2,46

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) foram expressos como média ± E.P.M, sendo que CN: controle negativo; Veículo: Tween 80; AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg; AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg; AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, a: p<0,05 em relação ao grupo CN (ANOVA- Bonferroni).

Semelhante aos demais parâmetros, os que avaliaram a função renal também não sofreram alteração significativa, após a administração de ácido betulínico e do veículo por 28 dias, como demonstrado na tabela 9.

Tabela 9. Avaliação das concentrações plasmáticas de uréia e creatinina após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas durante 28 dias.

Parâmetros Bioquímicos		
Grupos experimentais	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
CN	42,00 ± 2,82	0,31 ± 0,01
Veículo	42,63 ± 1,73	0,31 ± 0,02
AB 5	43,00 ± 2,33	0,31 ± 0,01
AB 10	42,88 ± 1,07	0,27 ± 0,03
AB 20	41,00 ± 2,00	0,31 ± 0,02

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média ± E.P.M, sendo que CN: controle negativo; Veículo: Tween 80; AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg; AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg; AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg, a: p<0,05 em relação ao grupo CN (ANOVA- Bonferroni).

5.5.3 Avaliação dos parâmetros hematológicos após protocolo de toxicidade oral em doses repetidas

Observou-se que a administração diária do ácido betulínico durante 28 dias não alterou significativamente os parâmetros hematológicos analisados, tais como número leucócitos, número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW e número de plaquetas.

A contagem diferencial dos leucócitos, realizadas por meio da leitura das distensões sanguíneas, não apresentou alteração significativa entre os grupos, bem como não foram observadas modificações degenerativas nas lâminas analisadas.

Tabela 10. Avaliação dos parâmetros hematológicos após protocolo de toxicidade oral do ácido betulínico em doses repetidas.

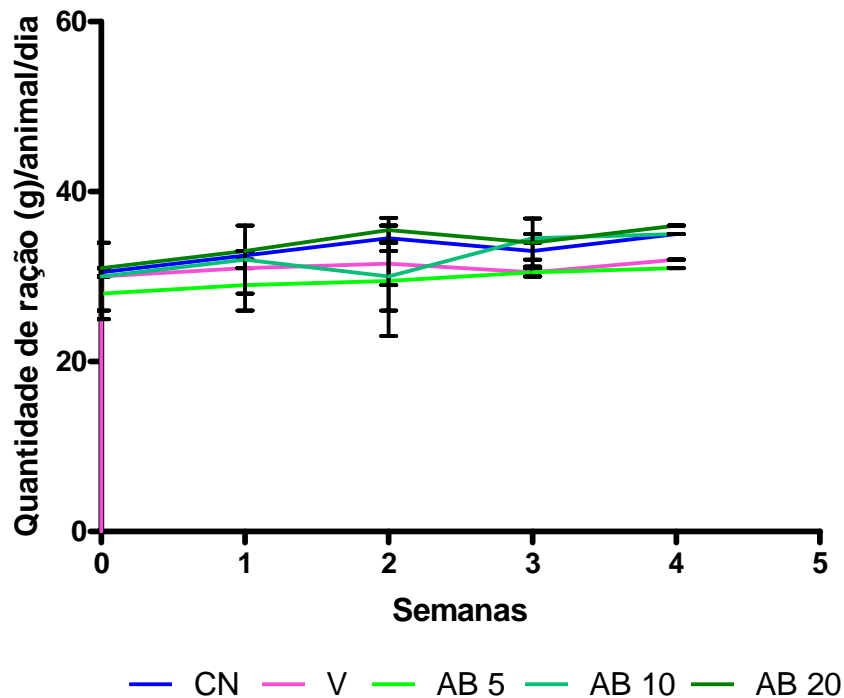
Parâmetros Hematológicos	Grupos Experimentais				
	CN	V	AB 5	AB 10	AB 20
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	8,67 \pm 0,23	8,86 \pm 0,21	8,63 \pm 0,13	8,71 \pm 0,37	8,83 \pm 0,19
Hemoglobina (g/dL)	13,75 \pm 0,42	14,03 \pm 0,46	13,80 \pm 0,32	13,68 \pm 0,49	13,66 \pm 0,28
Hematócrito (%)	48,05 \pm 1,38	48,99 \pm 1,70	48,51 \pm 1,13	49,04 \pm 2,23	47,93 \pm 1,28
VCM (fL)	55,40 \pm 0,39	55,19 \pm 0,93	56,18 \pm 0,77	56,24 \pm 0,65	54,25 \pm 0,56
HCM (pg)	15,84 \pm 0,19	15,80 \pm 0,19	15,99 \pm 0,26	15,73 \pm 0,23	15,49 \pm 0,13
CHCM (g/dL)	28,63 \pm 0,20	28,65 \pm 0,22	28,45 \pm 0,15	27,99 \pm 0,35	28,53 \pm 0,20
RDW (%)	10,76 \pm 0,20	10,94 \pm 0,26	10,89 \pm 0,42	11,44 \pm 0,28	10,99 \pm 0,31
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3,93 \pm 0,39	3,64 \pm 0,48	4,09 \pm 0,44	5,21 \pm 0,33	4,33 \pm 0,25
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,67 \pm 1,41	0,57 \pm 1,03	0,70 \pm 0,86	0,84 \pm 1,52	0,73 \pm 0,80
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,01 \pm 0,26	0,01 \pm 0,25	0,005 \pm 0,12	0,006 \pm 0,12	0,01 \pm 0,16
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	3,23 \pm 1,35	3,04 \pm 0,94	3,37 \pm 0,94	4,31 \pm 1,53	3,58 \pm 0,96
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,02 \pm 0,18	0,01 \pm 0,16	0,015 \pm 0,26	0,05 \pm 0,26	0,01 \pm 0,16
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	996 \pm 61,79	969 \pm 49,27	1081 \pm 53,02	1013 \pm 34,26	1116 \pm 43,69

Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW: amplitude de distribuição das hemácias, CN: controle negativo; Veículo: tween 80, AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg, AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg, AB 20: ácido betulínico 20mg/Kg, a: $p < 0,05$ em relação ao grupo CN (ANOVA- Bonferroni).

5.5.4 Avaliação consumo de ração e água e da massa corpórea dos grupos experimentais após protocolo de toxicidade oral em doses repetidas

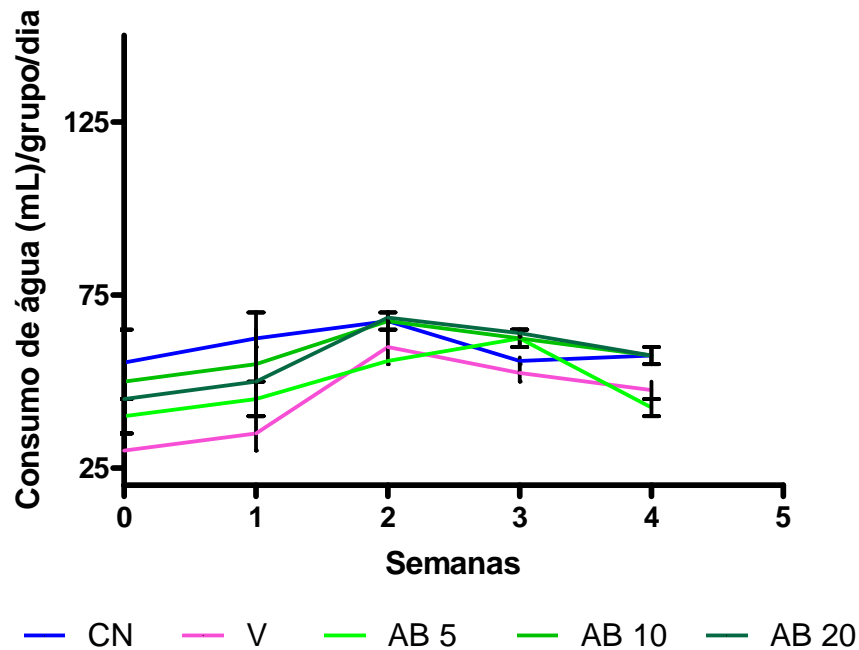
Os consumos de ração (Figura 26) e água (Figura 27), assim como o peso dos animais (Figura 28) foram verificados semanalmente e demonstraram que a administração diária de ácido betulínico durante 28 dias não alterou de forma significativa estes parâmetros.

Figura 26. Consumo de ração dos grupos experimentais após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico em diferentes concentrações.



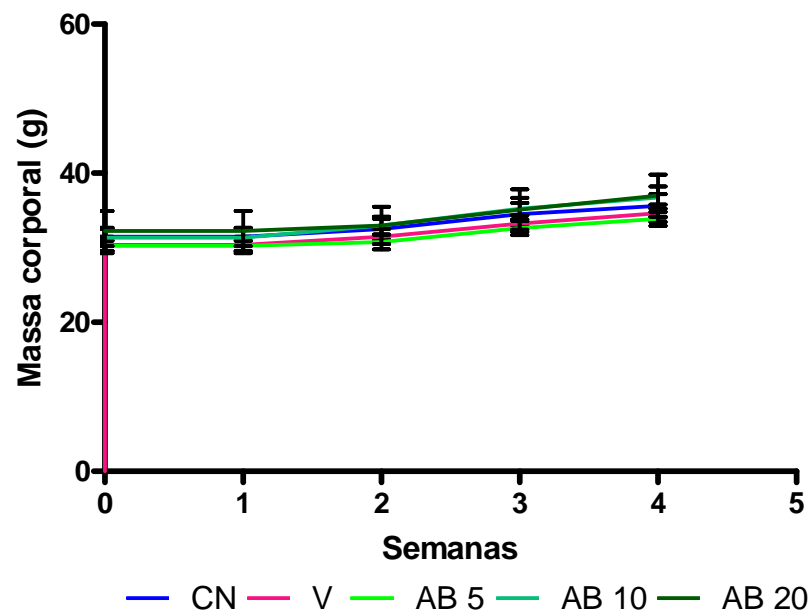
Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que CN: controle negativo;
 Veículo: Tween 80;
 AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg;
 AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg;
 AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg (ANOVA- Bonferroni).

Figura 27. Consumo de água dos grupos experimentais após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico em diferentes concentrações.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que CN: controle negativo; Veículo: Tween 80; AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg; AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg; AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg (ANOVA- Bonferroni).

Figura 28. Massa corporal dos grupos experimentais, em gramas, após 28 dias de tratamento com o ácido betulínico em diferentes concentrações.



Os resultados dos grupos experimentais (n=8) estão expressos como média \pm E.P.M, sendo que CN: controle negativo; Veículo: Tween 80; AB 5: ácido betulínico 5mg/Kg; AB 10: ácido betulínico 10mg/Kg; AB 20: ácido betulínico 20 mg/Kg (ANOVA- Bonferroni).

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O uso de plantas medicinais é uma prática recorrente em uma grande parcela da população brasileira, principalmente, aquela que se encontra em condições sócio- econômicas menos favoráveis (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Apesar disso, em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (FOGLIO *et al.*, 2006).

Verifica-se, ainda, o predomínio de trabalhos em fitoquímica, envolvendo principalmente o isolamento, a determinação estrutural (51%), o desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas (16%), enquanto trabalhos sobre atividade biológica representam apenas cerca de 19%. Esses números expressam a dificuldade que persiste em se realizar trabalhos multidisciplinares envolvendo fitoquímica e atividade biológica, apesar dos pesquisadores se proporem a realizar esse tipo de estudo (PINTO *et al.*, 2002).

Neste contexto, muita atenção tem sido direcionada a fitoconstituintes presentes em frutas e vegetais que podem ser úteis na prevenção de doenças, tais como diabetes e dislipidemias (MELO *et al.*, 2009).

Essas substâncias podem ser usadas como recursos terapêuticos alternativos para o tratamento de doença arterial coronariana e seus fatores de risco, como as dislipidemias e a diabetes. Tais doenças tem sido alvo de estudos, uma vez que é bem estabelecido que as doenças do sistema cardiovascular serão a causa mais comum de morte nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (MAGALHÃES *et al.*, 2004).

Diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença caracterizada por deficiência na produção de insulina que pode ser resultante da destruição imunomediada progressiva das células β do pâncreas (BELLAHUCEN *et al.*, 2011). Na diabetes *mellitus* tipo 2, a insulina tem seu efeito diminuído, fazendo com que a célula reduza a sua capacidade de captar a glicose, resultando em uma condição denominada resistência a insulina (JUNG *et al.*, 2007).

Uma das funções principais da insulina é manter o equilíbrio da glicose no organismo ao estimular o transporte dessa para os tecidos periféricos via transportador GLUT 4, que se expressa principalmente na musculatura esquelética, no músculo cardíaco e no tecido adiposo. Em indivíduos normais, a taxa de liberação de insulina pelas células beta pancreáticas ocorre em resposta ao aumento da glicose sanguínea (JUNG *et al.*, 2007).

Protocolos com modelos animais são muito utilizados em pesquisas relacionadas à diabetes. Dentre as toxinas diabetogênicas mais usadas experimentalmente está o aloxano, que induz hiperglicemia em ratos e camundongos (BELLAHCEN *et al.*, 2011). Ele pode aumentar os níveis glicêmicos em animais quando administrado por via intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose necessária depende da espécie, via de administração e estado nutricional. Quando injetada por via intraperitoneal, uma dose inferior a 150 mg/kg pode ser insuficiente para induzir a hiperglicemia em ratos (SZKUDELSKI, 2001).

O aloxano é um análogo tóxico da glicose que se acumula preferencialmente nas células beta através do transportador de glicose GLUT 2. Estudos *in vitro* mostram que essa substância é seletiva para as células beta pancreáticas causando necrose celular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) em uma reação redox cíclica que, em sua última etapa, produz radicais hidroxilas responsáveis pela morte celular (BELLAHCEN *et al.*, 2011). Além disso, o aloxano inibe a secreção de insulina pela inibição da glicoquinase. Tais mecanismos resultam na redução da oxidação da glicose e da geração de ATP, suprimindo, assim, o sinal transmitido pelo ATP para a secreção de insulina (LENZEN, 2008).

Dessa forma, o aloxano foi utilizado no presente trabalho e induziu efetivamente a diabetes pois, aumentou em 312,7% a glicemia do grupo CP. O tratamento com ácido betulínico nas doses de 10 e 20mg/Kg reduziu em 23,0% e 35,6%, respectivamente, os níveis plasmáticos de glicose. Os resultados de Melo *et al.*(2009) corroboram com os encontrados neste estudo, pois demonstraram que o ácido betulínico reduziu os níveis plasmáticos de glicose em protocolo de obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Outro triterpeno, também, apresentou atividade hipoglicêmica. Jang *et al.* (2010) obteve resultado similar aos descrito nesse trabalho, pois relatou que o ácido ursólico reduziu os níveis de glicose (12,3%) em protocolo de diabetes induzida por estreptozotocina.

Além da alteração da glicose sanguínea, o aloxano aumentou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos. Esses achados corroboram com o estudo realizado por Gao *et al.* (2009), sendo importante ressaltar que a elevação concomitante desses parâmetros bioquímicos, associados a hiperglicemia, aumentam o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

A dislipidemia pode ser desencadeada na diabetes devido à incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos, proporcionando a redução e/ou metabolização inadequada da glicose acarretando, conseqüentemente, a mobilização dos reservatórios lipídicos pelo organismo como fonte de energia. Durante esse processo, os ácidos graxos são mobilizados para a circulação, resultando em um aumento dos triglicerídeos e do colesterol séricos, de forma secundária. Esse aumento é proporcional aos níveis glicêmicos ocorrendo quando a doença encontra-se descontrolada (PAPI REDDY *et al.*, 2009).

Observou-se que o ácido betulínico, nas três concentrações, reduziu tanto os níveis plasmáticos de colesterol total quanto os de triglicerídeos, assim como foi encontrado por Melo *et al.* (2009), em protocolo de obesidade.

Como foi dito anteriormente, a diabetes está relacionada ao desenvolvimento de intolerância a glicose e resistência a insulina. Então, foi realizado o teste oral de tolerância a glicose (TOTG), utilizado na prática clínica e na pesquisa para identificar indivíduos com tolerância normal ou prejudicada à glicose (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2008). O TOTG foi realizado apenas com a dose de 10 mg/Kg de ácido betulínico (AB 10), uma vez que no protocolo de diabetes induzida por aloxano foi a menor dose com atividade hipoglicêmica.

Após 30 e 60 minutos da sobrecarga de glicose, o grupo AB 10 reduziu a concentração plasmática desse analito quando comparada ao controle positivo. Melo *et al.* (2010), também, demonstraram uma redução significativa dos níveis de glicose após 30 minutos da sobrecarga em um protocolo de TOTG, após sete dias de pré-tratamento com o triterpeno ácido oleanólico.

Os resultados de Jayaprakasam *et al.* (2006) são semelhantes aos encontrados neste trabalho, uma vez que verificou-se que ácido ursólico aumenta a sensibilidade e/ou a

secreção de insulina no protocolo de teste de tolerância a glicose em animais tratados com esse triterpeno durante 6 semanas.

Assim, é crescente o interesse no estudo da atividade hipoglicêmica, assim como a hipolipidêmica, de substâncias oriundas de plantas, frutas e vegetais, tais como os triterpenos que, em geral, são eficazes, menos tóxicos e apresentam menos efeitos colaterais (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2006).

As doenças no metabolismo dos lipídios são denominadas de dislipidemias e podem ser associadas à obesidade, diabetes, hipertensão e esteatose hepática. A hiperlipidemia, que inclui a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia, é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (ZHU *et al.*, 2010), as quais são responsáveis por cerca de 30% das mortes em todo o mundo (CAI *et al.*, 2011).

Segundo o estudo intitulado de *Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial*, a cada 1% de redução dos níveis plasmáticos de colesterol total ocorrerá uma diminuição de 2% no risco de surgimento de doenças coronarianas. Os níveis sanguíneos elevados das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) e dos triglicerídeos associados à redução dos níveis sanguíneos das lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) também aumentam esse risco de doenças coronarianas (ZHU *et al.*, 2010). Por isso, é importante o estudo de substâncias redutoras dos níveis de lipídios plasmáticos.

Em estudos pré-clínicos, são usados surfactantes para induzir a hiperlipidemia aguda, sendo empregados para o estudo do metabolismo do colesterol e dos triglicerídeos, bem como para avaliar a atividade hipolipidêmica de substâncias de origem natural (JINGJING; XIANGRONG, 2007; PATIL; SARAF; DIXIT, 2004; MANDUKHAIL; AZIZ; GILANI, 2010; OULMOUSEN *et al.*, 2011).

No início dos anos 50, observou-se que a injeção intravenosa de certos detergentes não iônicos resultava em soro lácteo mantido por aproximadamente 48 horas (KELLNER; CORRELL; LADD, 1951; MILLAR *et al.*, 2005). Estudos mais recentes demonstraram que esse aumento ocorre devido a uma maior produção hepática de lipídeos e uma redução do catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (ZHANG *et al.*, 2009).

No protocolo de indução de dislipidemia, foi utilizado o detergente não iônico triton WR-1339, o qual apresenta a capacidade de se associar as lipoproteínas no plasma, reduzindo sua metabolização (OTWAY; ROBINSON, 1967). O mesmo atua como um tensoativo, formando uma camada na superfície das lipoproteínas, impedindo sua absorção e aumentando sua concentração no sangue (PATIL; SARAF; DIXIT, 2004).

O triton WR 1339 (ou tiloxapol) promove um aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e de colesterol total. Isso ocorre, pois ele bloqueia o retorno das lipoproteínas ou dos seus produtos de degradação para o fígado, estimulando a síntese hepática de colesterol, em virtude de uma maior atividade da HMG-Co-A redutase (hidroximetilglutaril-coenzima A redutase) e inibindo a atividade enzimática da lipoproteína lipase (LPL) (MANDUKHAIL; AZIZ; GILANI, 2010; ROCHA, 2009).

Dessa forma, utilizou-se a dose de 400mg/Kg de triton WR 1339, como descrito por Jingjing e Xiangrong (2007). Semelhante aos estudos previamente citados, o triton também foi capaz de induzir a dislipidemia, pois aumentou significativamente os níveis plasmáticos de triglicerídeos e de colesterol total quando comparados os grupos controle negativo e positivo.

Os grupos tratados com o ácido betulínico na dose de 10 e 20mg/Kg (AB 10 e AB20) reduziram os triglicerídeos significativamente. Eu *et al.* (2010) demonstraram que a administração de saponinas triterpenóides em ratos obesos também foi capaz de reduzir a concentração de triglicerídeos no sangue, induzindo seletivamente a expressão da LPL e promovendo o aumento do catabolismo de lipoproteínas ricas em triglicerídeos.

A LPL é uma enzima responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes nas lipoproteínas plasmáticas, principalmente nos quilomícrons e nas lipoproteínas de muito baixa densidade (MORENO *et al.*, 2003). Dessa forma, o aumento dos níveis de LPL favorece a hidrólise intravascular de lipoproteínas (LAPLANT *et al.*, 2009) e a ativação de receptores PPAR pode regular sua produção, bem como diminuir a expressão de apo-C III que é um inibidor dessa enzima (EU *et al.*, 2010).

As dislipidemias estão relacionadas aos distúrbios hepáticos, uma vez que o fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo lipoproteico, pois está envolvido nos

processos de síntese, oxidação, transporte e excreção dos lipídios (LEE; GLIMCHER, 2009). O acúmulo de gordura no citoplasma dos hepatócitos, principalmente sob a forma de ácidos graxos livres e triglicerídeos, é considerado o primeiro passo para o desenvolvimento da esteato-hepatite (MARÍ *et al.*, 2006; ROCHA, 2009).

O aumento dos lipídios na circulação sanguínea pode desencadear um aumento do estresse oxidativo em vários órgãos, como fígado, coração e rins, devido à elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), apresentando um importante papel na inflamação crônica que ocorre em resposta a doenças como a aterosclerose (ROCHA, 2009).

Com o intuito de avaliar um possível dano hepático, neste protocolo foi verificada a atividade antioxidante do ácido betulínico por meio das dosagens de TBARS (substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico) e de SOD (superóxido dismutase) em homogenato de fígado.

De acordo com Liu (2005), os efeitos benéficos dos ácidos ursólico e oleanólico sobre o fígado podem ser devido às atividades antioxidante e antiinflamatória desses triterpenóides. Além disso, Yang *et al.* (2006) sugeriram que o estresse oxidativo pode diminuir a atividade da LPL, o que resulta em uma alteração do metabolismo lipídico.

As espécies reativas de oxigênio podem reagir com uma variedade de biomoléculas, como lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos antioxidantes. Quando esse equilíbrio é prejudicado, é desencadeada uma situação de estresse oxidante que resulta em uma produção exacerbada de radicais livres (YANG *et al.*, 2008).

Dentre os alvos mais suscetíveis a ação dos radicais livres tem-se os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular. A interação desses radicais com componentes lipídicos da membrana promove a peroxidação lipídica, causando um aumento da permeabilidade e morte celular (SARAVANAN; VISWANATHAN; PUGALENDI, 2006).

Uma grande quantidade de compostos oxigenados, particularmente aldeídos, como o malonaldeído, é produzida durante o ataque desses radicais a membrana lipoproteica (YANG *et al.*, 2008). Por isso, foi avaliado o TBARS onde o ácido tiobarbitúrico reage com

produtos da peroxidação lipídica, sendo o principal deles o malonaldeído. Após o protocolo do triton, foi dosado o TBARS nos homogenatos dos animais que receberam ácido betulínico nas doses de 10 (AB 10) e 20 mg/Kg (AB 20), pois esses grupos tiveram seus triglicerídeos plasmáticos reduzidos após o tratamento de forma significativa. Ambas as doses foram capazes de promover uma redução ($p < 0.05$) nos níveis hepáticos de TBARS. Esse resultado é relevante, uma vez que acredita-se que a peroxidação lipídica está envolvida com a modificação oxidativa de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (NEVIN; RAJAMOHAN, 2004).

Além disso, foi avaliada a atividade da SOD, uma enzima importante na proteção contra lesões oxidativas, visto que ela está envolvida na eliminação de ânions superóxido, sendo fundamental para a manutenção do equilíbrio entre os sistemas oxidantes e antioxidantes (YANG *et al.*, 2008). Neste protocolo, a atividade da SOD aumentou nos animais tratados com ácido betulínico nas doses de 10 e 20 mg/Kg, tal resultado, somado a diminuição da peroxidação lipídica verificada após a dosagem do TBARS, demonstram uma importante atividade antioxidante do AB.

De acordo com os achados do protocolo descrito, verificou-se a importância de se realizar um experimento que avaliasse o efeito do ácido betulínico na hipercolesterolemia induzida de forma crônica, uma vez que o colesterol total é um parâmetro que muitas vezes necessita de um tempo maior para a sua redução. Para tal, foi utilizado modelo de indução de hipercolesterolemia por dieta modificada.

Os hábitos alimentares, como a ingestão contínua de grande quantidade de gorduras saturadas e colesterol, estão diretamente relacionados à hipercolesterolemia e a suscetibilidade a aterosclerose (OTUNOLA *et al.*, 2010).

O colesterol é a molécula precursora dos ácidos biliares, sendo esses classificados em secundários e primários. Os ácidos biliares desoxicólico e litocólico são denominados de secundários enquanto que os primários são constituídos pelos ácidos cólico e quenodesoxicólico. O ácido cólico é um componente importante para a absorção de lipídios e sua ingestão conjunta com o colesterol, por períodos prolongados, pode desencadear um quadro de hipercolesterolemia, bem como a formação de cálculos biliares de colesterol em ratos. Esse aumento da absorção do colesterol pode ser devido à natureza anfipática dos

ácidos biliares, promovendo a formação de micelas que, por sua vez, auxiliam na absorção dos lipídios provenientes da alimentação (MURPHY *et al.*, 2005).

Diante do que foi exposto, observa-se que o ácido cólico foi adicionado à ração para aumentar a absorção do colesterol presente na dieta. Assim, a ração modificada contendo colesterol, ácido cólico, óleo de coco e ração padrão foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de colesterol total.

Outros estudos utilizaram dietas ricas em colesterol para induzir a hipercolesterolemia em animais (CHANDER *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; LIN; VERMEER; TRAUTWEIN, 2009; MANDUKHAIL; AZIZ; GILANI, 2010). Isso porque, esses modelos experimentais de indução são úteis para compreender melhor alterações do metabolismo do colesterol, bem como para a descoberta de novas drogas detentoras de atividade redutora de colesterol (OTUNOLA *et al.*, 2010).

Segundo Melo *et al.* (2009), animais alimentados com dieta hipercalórica e tratados com ácido betulínico reduziram não apenas seus níveis plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos, como também a esteatose hepática, o ganho de peso e o tamanho dos adipócitos, indicando que ele reduz o acúmulo de lipídeos nessas células.

Observou-se, também, que o ácido betulínico inibiu a enzima Acil-CoA: colesterol acetiltransferase (ACAT), cuja inibição é uma estratégia útil para o tratamento da hipercolesterolemia, reduzindo, conseqüentemente, um dos fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (LEE *et al.*, 2006). A ACAT está localizada no retículo endoplasmático celular e cataliza a reação de esterificação do colesterol livre. Podendo ser encontrada duas isoformas ACAT 1 e ACAT 2 (LEE *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2005).

Lin *et al.* (2009) demonstraram que outros triterpenos como os ácidos oleanólico e ursólico foram os responsáveis pela redução do colesterol promovida pelo extrato de espinheiro, já que o efeito do extrato e da mistura de triterpenos foi equivalente. Esse efeito também foi atribuído a capacidade de inibição intestinal da ACAT por essas substâncias.

No presente estudo, os animais tratados com o ácido betulínico apresentaram uma redução significativa no colesterol total plasmático. Entretanto, dieta hipercolesterolêmica

proporcionou uma redução dos níveis sanguíneos de triglicerídeos, esse resultado pode ser atribuído a um dos componentes da ração modificada.

Um desses componentes é o óleo de coco, que contém até 93% de ácidos graxos saturados e, dentre eles, predominam os de cadeia média. Ele promove um aumento maior do colesterol HDL plasmático e uma diminuição da relação LDL/HDL em relação a outras fontes de gordura saturada. Os ácidos graxos de cadeia média, em comparação com os de cadeia longa, são mais facilmente digeridos, absorvidos e oxidados (DELA PAZ *et al.*, 2010; SENEVIRATNE; KOTUWEGEDARA; EKANAYAKE, 2011). Além disso, alguns estudos apontam que a água de coco também é capaz de reduzir os lipídios em animais (SANDHYA; RAJAMOHAN, 2006). Portanto, pode-se sugerir que a redução dos triglicerídeos tenha sido causada pelo óleo de coco, entretanto o mecanismo de redução não é conhecido.

É necessário um período maior de tratamento com agentes hipocolesterolêmicos, uma vez que o colesterol possui uma produção endógena significativa. Diante disso, pode-se justificar a razão do ácido betulínico ter sido capaz de reduzir os níveis plasmáticos de colesterol total somente no protocolo de hipercolesterolemia induzida por dieta modificada, por ser um estudo mais prolongado, diferente do modelo experimental de indução aguda de dislipidemia por triton. Além disso, as vias de indução de hipercolesterolemia desses protocolos foram distintas, podendo estar relacionadas com o mecanismo de redução do colesterol total promovido pelo ácido betulínico.

Com o aumento do uso das plantas e de substâncias isoladas delas, cresce a necessidade de estudos científicos aprofundados que visem comprovar o seu emprego popular e investigar seus possíveis efeitos tóxicos, por isso, a relevância de estudos toxicológicos pré-clínicos é notável (WANG *et al.*, 2007).

Esses estudos envolvem a avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Dentre os bioquímicos, as funções renal, hepática e os perfis glicêmico e lipídico são de grande importância (AFOLAYAN *et al.*, 2009). Alterações na concentração de lipídios como o colesterol total, e triglicerídeos podem fornecer informações úteis sobre o metabolismo energético e sua relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Os níveis elevados desses lipídios e da glicose são associados ao surgimento da aterosclerose (ASHAFA *et al.*, 2009).

Os resultados encontrados demonstraram que a administração de ácido betulínico durante 28 dias não alterou significativamente os níveis plasmáticos de glicose, colesterol total e triglicerídeos, sugerindo que a utilização de tal triterpeno não aumentou o risco para o desenvolvimento de diabetes e de doenças cardiovasculares.

Existem, ainda, enzimas encontradas no soro que permitem a investigação da integridade estrutural dos tecidos, cujos níveis elevados podem ser oriundos de lesão celular. A dosagem de enzimas séricas é, portanto, uma ferramenta para o diagnóstico, pois fornecem informações sobre a natureza patológica do dano (AFOLAYAN *et al.*, 2009; APPIDI *et al.*, 2009).

A alanina aminotransaminase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) são enzimas presentes nos hepatócitos e são utilizadas na investigação de lesões hepatocelulares. Assim, tais analitos são indicadores sensíveis e podem avaliar qualitativamente e quantitativamente o dano hepático (APPIDI *et al.*, 2009). A AST encontra-se predominantemente no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo esquelético estriado, rins e pâncreas, enquanto que a ALT é encontrada no fígado, rins e coração. A elevação da atividade dessas enzimas pode ocorrer por alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade celular, indução de enzimas microsomais ou lesão estrutural associada à necrose, além de colestase ou isquemia hepacelular (VASCONCELOS *et al.*, 2007). De acordo com os resultados, verifica-se que o ácido betulínico não modificou significativamente os parâmetros que avaliam a função hepática.

Os parâmetros mais empregados para avaliar a função renal são a uréia e a creatinina. Tais marcadores renais podem ser usados para analisar a capacidade funcional dos néfrons de humanos e animais (ASHAFA *et al.*, 2009). O aumento da uréia no sangue pode estar relacionado com o aumento do catabolismo protéico ou com disfunção renal, enquanto que a creatinina se eleva quando a filtração glomerular diminui (MENDES *et al.*, 2010). Os resultados obtidos sugerem que o ácido betulínico não causou toxicidade renal.

Além dos parâmetros bioquímicos, foram avaliados os hematológicos. Neste protocolo, a administração do ácido betulínico por 28 dias não alterou o hemograma dos animais. Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM relacionam-se com as células

vermelhas do sangue, que associados a outros parâmetros, são importantes para o diagnóstico das anemias e outras modificações na eritropoese (ODEYEMI *et al.*, 2009). A ausência de alterações indicam que a substância em estudo não afetou a incorporação de hemoglobina, o tamanho médio nem a morfologia das células vermelhas (AFOLAYAN *et al.*, 2009).

A alteração dos leucócitos podem ocorrer por uma deficiência na produção dessas células pela medula óssea ou na remoção dessas da circulação. Os linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos são importantes para o funcionamento normal do sistema imune (ODEYEMI *et al.*, 2009). Após a administração de ácido betulínico, nenhuma dessas células sofreu alterações morfológicas e numéricas significativas. Assim, a leucopoese também não foi alterada, apesar de tal sistema ser um dos mais sensíveis à substâncias tóxicas, sendo um importante parâmetro na identificação de toxicidade (MUKINDA; SYCE, 2007).

As plaquetas também não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados. Tais fragmentos celulares estão presentes em número e tamanho normais, sugerindo que a trombopoese não foi afetada (AFOLAYAN *et al.*, 2009; ASHAFI *et al.*, 2009; ODEYEMI *et al.*, 2009). Dessa forma, pode-se inferir que o ácido betulínico não alterou nenhum dos parâmetros hematológicos avaliados, o que indica que não é tóxico para as células sanguíneas após 28 dias de tratamento.

Além de alterações hematológicas e bioquímicas, a toxicidade sistêmica também pode ser observada através da redução nos consumos de água e ração, modificações de comportamento, apatia e má condição da pelagem com presença de pêlos eriçados (RAUBER; MELLO; MELLO, 2006). Estes sinais não foram observados neste estudo, além disso, os consumos de água e ração, bem como o peso dos animais, não se modificaram de forma significativa, mostrando que não houve a supressão nem estímulo do apetite. Verificou-se, ainda, que a administração do ácido betulínico não causou a morte de nenhum animal durante os 28 dias, demonstrando a ausência de toxicidade nas condições estudadas.

Além dos grupos tratados com o ácido betulínico, avaliou-se também a toxicidade do veículo utilizado para solubilizá-lo em meio aquoso, o tween 80 (polissorbato 80). Ele é um surfactante não iônico amplamente usado como aditivo alimentar e em produtos farmacêuticos, assumindo função emulsificante, dispersante ou estabilizadora. Ele produz emulsões de textura fina, com boa estabilidade e é considerado resistente a mudanças de pH

(DAHER; BAROODY; HOWLAND, 2003), sendo bastante utilizado para solubilizar drogas pouco solúveis em água (SEEBALLUCK *et al.*, 2004).

Sua administração não alterou a massa corpórea e consumo de ração, assim como os parâmetros bioquímicos e hematológicos estudados. Assim, o veículo utilizado também não apresentou toxicidade aparente ao fim dos 28 dias de tratamento.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se que, o ácido betulínico, nos protocolos estudados, foi capaz de reduzir a glicemia de animais diabéticos, bem como diminuir o pico hiperglicêmico provocado por sobrecarga de glicose.

Mostrou atividade hipolipidêmica ao reduzir os triglicerídeos plasmáticos de animais dislipidêmicos e o colesterol total sanguíneo de animais com hipercolesterolemia induzida por dieta modificada. Demonstrou, também, uma importante ação antioxidante devido à capacidade de reduzir a peroxidação lipídica e aumentar a expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase no fígado.

O triterpeno em estudo não apresentou toxicidade, visto que não promoveu alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos após o estudo toxicológico.

Portanto, o ácido betulínico apresentou resultados promissores em relação ao seu potencial terapêutico para o tratamento da diabetes e das dislipidemias, bem como quanto a sua segurança, entretanto, outros estudos *in vivo* e *in vitro* são necessários a fim de estabelecer seu mecanismo de ação farmacológica.

REFERÊNCIAS

- AFOLAYAN, A.J.; YAKUBU, M.T.; APPIDI, J.R.; MOSTAFA, M. Toxicological implications of aqueous extract of *Clematis brachiata* Thunb. leaves in male Wistar rats. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v.3, n.11, p.531-538, 2009.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods of Enzymatic Analyses**, v.2, p.673-678, 1984.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.18, n.3, p.472-508, 2008.
- ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **J. Ethnopharmacol.**, v.107, n.11, p.449-455, 2006.
- ANDRIKOPOULOS, S.; BLAIR, A.R.; DELUCA, N.; FAM, B.C.; PROIETTO, J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.295, n.6, p.E1323-E1332, 2008.
- APPIDI, J. R.; YAKUBU, M. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A.J. Toxicological evaluation of aqueous extracts of *Hermannia incana* Cav. leaves in male Wistar rats. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n.10, p. 2016-2020, 2009.
- ASHAFA, A. O. T.; YAKUBU, M. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Felicia muricata* Thunb. leaves in Wistar rats. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 8, n.6, p. 949-954, 2009.
- ATTA-UR-RAHMAN; ZAREEN, S.; CHOUDHARY, M. I.; AKHTAR, M. N.; KHAN, S. N. α -Glucosidase inhibitory activity of triterpenoids from *Cichorium intybus*. **J. Nat. Prod.**, v.71, n.5, p.910-913, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p.679-688, 2009.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 44, n.1, p.276-287, 1971.
- BELLAHCEN, S.; MEKHFI, H.; ZIYYAT, A.; LEGSSYER, A.; HAKKOU, A.; AZIZ, M.; BNOUHAM, M. Prevention of Chemically Induced Diabetes Mellitus in Experimental Animals by Virgin Argan Oil. **Phytother. Res.**, 2011.
- BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- BORGGREVE, S. E.; VRIES, R.; DULLAART, R. P. F. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.33, n.12, p.1051-1069, 2003.

BOYLE, J. P.; HONNEYCUTT, A. A.; NARAYAN, K. M.; HOERGER, T. J.; GEISS, L.S.; CHEN, H.; THOMPSON, T. J. Projections of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the US. **Diabetes Care**, v. 24, p. 1936–1940, 2001.

BRAGA, F.; AYRES-SARAIVA, D.; GATTASS, C.R.; CAPELLA, M. A. M. Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): Possible use in cancer chemotherapy. **Cancer Lett.**, v. 248, n. 1, p. 147-152, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº. 06 de 31 de janeiro de 1995. Instituir e normatizar o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 fev. 1995. v. 200, seção 1, p.1523- 1524.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução Especial nº 90, de 16 de março de 2004. Determina a publicação da “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica e clínica de fitoterápicos”. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

CAI, L.; ZHANG, L.; LIU, A.; LI, S.; WANG, P. Prevalence, awareness, treatment, and control of dyslipidemia among adults in Beijing, China. **J. Atherosclerosis Thrombosis**, 2011.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciênc. Cultura**, v. 55, n. 3, 2003.

CARDOSO, A. P. Z.; NOGUEIRA, M. S.; HAYASHIDA, M.; SOUZA, L.; CESARINO, E. J. Aspectos clínicos e socioeconômicos das dislipidemias em portadores de doenças cardiovasculares. **Rev. Saúde Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 417-436, 2011.

CARVALHO, A. M. **Avaliação do estresse oxidativo em ilhotas pancreáticas humanas e em cultura de células INS- 1E**. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 40, n. 3, jul./set. 2004.

CHANDER, R.; SINGH, K.; KHANNA, A.K.; KAUL, S.M.; PURI, A.; SAXENA, R.; BHATIA, G.; RIZVI, F.; RASTOGI, K. Antidyslipidemic and antioxidant activities of different fractions of *terminalia arjuna* stem bark. **Indian J. Clin. Biochem.**, 2004.

CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **Plant J.**, v. 66, p. 212–229, 2011.

CHEN, J.; LI, L. Hypolipidemic effect of flavonoids from mulberry leaves in triton WR-1339 induced hyperlipidemic mice. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.**, v. 16, Suppl., p. 290-294, 2007.

CHUNG, M. Y.; RHO, M. C.; LEE, S. W.; PARK, H. R.; KIM, K.; LEE, I. A.; KIM, D. H.; JEUNE, K. H.; LEE, H. S.; KIM, Y. K. Inhibition of diacylglycerol acyltransferase by betulinic acid from *Alnus hirsuta*. **Planta. Med.**, v. 72, p. 267–269, 2006.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 10, p. 25, 2011.

DAHER, C.F.; BAROODY, G.M.; HOWLAND, R. J. Effect of a surfactant, Tween 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rat. **Food Chem. Toxicol.**, 2003.

DELA PAZ, C.; JIMENO, C.; SY, R.; PUNZALAN, F. E.; DELA PENA, P. The effect of virgin coconut oil on lipid profile and fasting blood sugar: A phase I clinical trial. **Philippine J. Int. Med.**, 2010.

DANIELS, T. F.; KILLINGER, K. M.; MICHAL, J. J.; WRIGHT JR, R. W.; JIANG, Z. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. **Int. J. Biol. Sci.**, 2009.

DAVIES, A.; BLAKELEY, A. G. H.; KIDD, C. **Fisiologia Humana**. Artmed Editora, Prto Alegre, 2002.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p. 70-77, 1959.

EU, C.H.A.; LIM, W.Y.A.; TON, S.H.; KADIR, K.A. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. **Lipids Health Dis.**, v. 9, p. 81, 2010.

EUROASPIRE II Study Group. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries. Principal results from EUROASPIRE II Euro Heart Survey Programme. **Eur. Heart J.**, v. 22, p. 554-572, 2001.

ESPINOSA, J.J.R.; RIOS, M.Y.; MARTÍNEZ, S. L.; VALLEJO, F.L.; FRANCO, J.L.M.; PAOLI, P.; CAMICI, G.; VAZQUEZ, G.N.; ANDRADE, R.O.; SOTO, S.E. Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTPe1B: In vitro, in silico, and in vivo approaches. **Eur. J. Med. Chem.**, 2011.

FARESE, R.V.; CASES, S.; SMITH, S.J. Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol Acyltransferase. **Curr. Opin. Lipidol.**, 2000.

FARIAS, J. A. C.; FERRO, J. N. S.; SILVA, J. P. AGRA, I. K. R.; OLIVEIRA, F. M.; CANDEA, A. L. P.; CONTE, F. P.; FERRARIS, F. K.; HENRIQUES, M. G. M. O.; CONSERVA, L. M.; BARRETO, E. Modulation of inflammatory processes by leaves extract from *clusia nemorosa* both in vitro and in vivo animal models. **Inflammation**, 2011.

FERREIRA, J. M. **Avaliação do potencial terapêutico e da toxicidade das sementes de *Bixa orellana* L. no tratamento de dislipidemias**. 179 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fontes de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Multiciência**,

2006. Disponível em: < http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf >. Acesso em: 2 jan. 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P.; NAKAMURA, M. J.; SIANI, A. C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev. Bras. Farmacogn.**, p. 338-343, 2005.

FULDA, S.; KROEMER, G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 17/18, 2009.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, n.2, p.178-182, 2005.

GAO, D.; LI, Q.; LI, Y.; LIU, Z.; FAN, Y.; LIU, Z.; ZHAO, H.; LI, J.; HAN, Z. Antidiabetic and antioxidant effects of oleanolic acid from *ligustrum lucidum* ait in alloxan-induced diabetic rats. **Phyther. Res.**, v. 23, p. 1257–1262, 2009.

GODOI, V. **Avaliação da lesão e recuperação muscular após estiramento em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GONÇALVES, M. C. R.; MOURA, L. S. A.; RABELO, L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CRUZ, H. M. M.; CRUZ, J. Natural products inhibitors of HMG CoA reductase. **Rev. Bras. Farm.**, v. 81, p. 63-71, 2000.

GUIDONI, C. M. **Estudo da utilização de medicamentos em usuários portadores de diabetes mellitus atendidos pelo sistema único de saúde**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

HALL, J.A.; GRADIN, J.L.; ANDREASEN, C.B.; WANDER, R.C. Use of a nonionic detergent (Triton WR1339) in healthy cats to assess hepatic secretion of triglyceride. **Am. J. Vet. Res.**, v. 61, n. 8, p. 941-950, 2000.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HORVATH, K.; KOCH, K.; JEITLER, K.; MATYAS, E.; BENDER, R.; BASTIAN, H.; LANGE, S.; SIEBENHOFER, A. Effects of treatment in women with gestational diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, Apr. 2010.

HOUNG, N. T. O.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAAKI, K.; WAATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietinaamese ginseng saponin and its constituents. **Bio. Pharm. Bull.**, v. 21, p. 978-981, 1998.

JANG, S. M.; KIM, M. J.; CHOI, M. S.; KWON, E.Y.; LEE, M. K. Inhibitory effects of ursolic acid on hepatic polyol pathway and glucose production in streptozotocin-induced diabetic mice. **Metab. Clin. Exp.**, v. 59, p. 512–519, 2010.

JALDIN, R. G.; FALCÃO FILHO, H. A.; SEQUEIRA, YOSHIDA, W. B. Atherosclerotic lesion formation in rabbits fed on egg yolk-supplemented diet: an inexpensive experimental model. **J. Vasc. Bras.**, v. 5, n. 4, 2006.

JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L. K.; SCHUTZKI, R. E.; TAI, M.H.; NAIR, M.G. Amelioration of Obesity and Glucose Intolerance in High-Fat-Fed C57BL/6 Mice by Anthocyanins and Ursolic Acid in Cornelian Cherry (*Cornus mas*). **J. Agric. Food Chem.**, 2006.

JORGE, P.A.R.; NEYRA, L.C.; OSAKI, R.M.; ALMEIDA, E.; BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lipídeos plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 70, n. 2, p. 1-5, 1998.

JUNG, S.H.; HÁ, Y.J.; SHIM, E.K.; CHOL, S.Y.; JIN, J.L.; YUN-CHOL, H.S.; LEE, J.R. Insulin-mimetic and insulin-sensitizing activities of a pentacyclic triterpenoid insulin receptor activator. **Biochem. J.**, v. 403, p. 243–250, 2007.

KELLNER, A.; CORRELL, J.W.; LADD, A. T. Sustained hyperlipemia induced in rabbits by means of intravenously injected surface-active agents. **J. Exp. Med.**, p. 373–384, 1951.

KIM, H.Y.; JEONG, D.M.; JUNG, H.J.; JUNG, Y.J.; YOKOZAWA, T. CHOI, J.S. Hypolipidemic effects of *Sophora flavescens* and constituents in poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 1, p. 73-78, 2008.

KOLANKIEWICZ, F.; GIOVELLI, F. M. H.; BELLINASO, M. L. Estudy of lipidic profile and prevalence of dyslipidemias in adult. **RBAC**, v. 40, n. 4, p. 317-320, 2008.

LAPLANT, M.; FERTUCCIA, W.T.; SOUCY, G.; BLANCHARD, P.G.; RENAUND, A.; BERGER, J.P.; OLIVECRONA, G.; DESHAIES, Y. Tissue-specific postprandial clearance is the major determinant of PPAR α -induced triglyceride lowering in the rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 296, p. R57-R66, 2009.

LEE, A. H.; GLIMCHER, L. H. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2835–2850, 2009.

LEE, W. S.; IM, K. R.; PARK, Y. D.; SUNG, N. D.; JEONG, T. S. Human ACAT-1 and ACAT-2 inhibitory activities of pentacyclic triterpenes from the leaves of *Lycopus lucidus* TURCZ. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 2, p.382-384, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3rd ed. New York: Sarvier, 2002.

LEITE, C. P. **Avaliação dos efeitos farmacológicos de (O-metil)-N-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de *Aniba riparia* (NEES) mez (*lauraceae*) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos**. 2008. 134f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

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

LIN, Y.; VERMEER, M. A.; TRAUTWEIN, E.A. Triterpenic Acids Present in Hawthorn Lower Plasma Cholesterol by Inhibiting Intestinal ACAT Activity in Hamsters. **Evid Based Complement Alternat. Med.**, 2009.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, n.1/2, p.92-94, 2005.

LU, H.; CHEN, J.; LI, W.L.; REN, B.R.; WU, J.L.; KANG, H.Y.; ZHANG, H.Q.; ADAMS, A.; De KIMPE, N. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from *Folium Eriobotryae*. **J. Ethnopharmacol.**, v.122, n.3, p.486-491, 2009.

LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M. C. High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. **Subcell Biochem.**, v. 51, p. 183–227, 2010.

MABEKU, L.B.K.; BENG, V.P.; ESSAME, O.; ETOA, F.X. Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v.111, n.3, p.598-606, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MAGALHÃES, M.E.C.; BRANDÃO, A.A.; FREITAS, E.V.; POZZAN, R.; BRANDÃO, A.P. Novas perspectivas no tratamento de dislipidemias. **Rev. SOCERJ**, p. 105-111, 2004.

MANDUKHAIL, S.R.; AZIZ, N.; GILANI, A.H. Studies on antidyslipidemic effects of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit, leaves and root extracts. **Lipids Health Dis.**, 2010.

MARÍ, M.; CABALLERO, F.; COLELL, A.; MORALES, A.; CABALLERIA, J.; FERNANDEZ, A.; ENRICH, C.; FERNANDEZ-CHECA, J. C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. **Cell Metab.**, p. 185-198, 2006.

MARIZ, S. R.; ARAÚJO, M. S. T.; CERQUEIRA, G. S.; ARAÚJO, W. C.; DUARTE, J. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A. Avaliação histopatológica em ratos após tratamento agudo com o extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.18, n.2, p.213-216, 2008.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** 4. ed. rev. ampl. Fortaleza: UFC, 2002.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. **Trends in Biotechnol.**, v. 16, p. 349-355, 1998.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene [alpha]-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 559, p. 227-235, 2007.

- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.**, v.52, p. 711-760, 1983.
- MELLO, A. P. Q.; SILVA, I. T.; ABDALLA, D. S. P.; DAMASCENO, R. T. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, p. 257–265, 2011.
- MELO, C. M. **Estudo do efeito farmacológico da α , β - AMIRINA, uma mistura de triterpenos isolados de *Protium heptaphyllum*, na hepatite aguda experimental.** Tese (Doutorado em Farmacologia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- MELO, C. L.; QUEIROZ, M. G. R.; ARRUDA FILHO, A. C. V.; RODRIGUES, A. M.; SOUSA, D. F.; ALMEIDA, J. G. L.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; MENEZES, D. B.; MELO, T. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Betulinic Acid, a Natural Pentacyclic Triterpenoid, Prevents Abdominal Fat Accumulation in Mice Fed a High-Fat Diet. **J. Agric. Food Chem.**, 2009.
- MELO, C.; QUEIROZ, M. G. R.; FONSECA, S. G. C.; BIZERRA, A. M. C.; LEMOS, T. L. G.; MELO, T. S.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, v. 185, 2010.
- MENDES, M.M.; VALE, L. H. F.; LUCENA, M. N.; VIEIRA, S. A. P. B.; IZILDORO, L. F. M.; JUNIOR, R. J. O.; SOARES, A. M.; ALCÂNTARA, T.; M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Acute Toxicity of *Schizolobium parahyba* Aqueous Extract in Mice. **Phytother. Res.**, v. 24, p. 459–462, 2010.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v.46, n.10, 2011.
- MILLAR, J.S.; CROMLEY, D.A.; McCOY, M.G.; RADER, D.J.; BILLHEIMER, T. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. **J. Lipid Res.**, v. 46, 2005.
- MITTERMEIER, R. A.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Mega diversidade**, v.1, n. 1, p.14-21, 2005.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p.105-111, 2001.
- MONTEIRO, M. P. **Bebida à base de subproduto da uva: efeitos sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis.** Tese (Doutorado em Nutrição em Saúde Pública)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- MORENO, D.A.; ILIC, N.; POULEV, A.; BRASAEMLE, D.L.; FRIED, S.K.; RASKIN, I. Inhibitory Effects of Grape Seed Extract on Lipases. **Nutrition**, v. 19, n. 10, 2003.
- MUKINDA, J.T.; SYCE, J.A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, n.1, p.128-144, 2007.

MURPHY, C.; PARINI, P.; WANG, J.; BJORKHEM, I.; EGGERTSEN, G.; GAFVELS, M. Cholic acid as key regulator of cholesterol synthesis, intestinal absorption and hepatic storage in mice. **Biochim. Biophys. Acta**, 2005.

NASCIMENTO, C. **Medicina Alternativa de A a Z**. 1. ed. Uberlândia: Natureza, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 4th ed. 2006.

NEVIN, K.G.; RAJAMOCHAN, T. Beneficial effects of virgin coconut oil on lipid parameters and in vitro LDL oxidation. **Clin. Biochem.**, v. 37, 2004.

ODEYEMI, O. O.; YAKUBU, M. T.; MASIKA, P. J.; AFOLAYAN, A. J. Toxicological Evaluation of the Essential Oil from *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* Leaves in Rats. **J. Med. Food**, 2009.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OJEZELE, M.O.; ABATAN, O.M. Hypoglycaemic and coronary risk index lowering effects of *Bauhinia thonongii* in alloxan induced diabetic rats. **African Health Sci.**, v.11, n.1, p.85-89, 2011.

OLIVEIRA, C. P. **Estudo da cinética plasmática do colesterol livre e esterificado em pacientes diabéticos tipo 2 com ou sem doença coronariana disgnosticada**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Endocrinologia)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

OTUNOLA, G.A.; OLOYEDE, O.B.; OLADIJI, A.T.; AFOLAYAN, A.A. Effects of diet-induced hypercholesterolemia on the lipid profile and some enzyme activities in female Wistar rats. **Afr. J. Biochem. Res.**, v.4, n.6, p.149-154, 2010.

OTWAY, S.; ROBINSON, D.S. The use of a non-ionic detergent (triton wr1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. **J. Physiol.**, v.190, p.321-322, 1967.

OULMOUSEN, F.; SAILE, R.; GNAOUI, N.E.; BENOMAR, H.; LKHIDER, M.; AMRANI, S.; GHALIM, N. Hypolipidemic and Anti-Atherogenic Effect of Aqueous Extract of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Extract in an Experimental Model of Atherosclerosis Induced by Triton WR-1339. **Eur. J. Sci. Res.**, v. 52, n. 1, p.91-99, 2011.

PAPI REDDY, K.; SINGH, A.B.; PURI, A.; SRIVASTAVA, A.K.; NARENDER, T. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, 2009.

PAGLIALUNGA, S.; JULIEN, P.; TAHIRI, Y.; CADELIS, P.; BERGERON, J.; GAUDET, D.; CIANFLONE, K. Lipoprotein lipase deficiency is associated with elevated acylation stimulating protein plasma levels. **J. Lipid Res.**, v. 50, n. 6, p. 1109–1119, 2009.

- PATIL, U. K.; SARAF, S.; DIXIT, V.K. Hypolipidemic activity of seeds of *Cassia tora* Linn. **J. Ethnopharmacol.**, v.90, n. 2/3, p. 249-252, 2004.
- PERTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C. Gastroprotective effect and cytotoxicity of terpenes from the Paraguayan crude drug "yagua rova" (*Jatropha isabelli*). **J. Ethnopharmacol.**, v.111, n. 3, p.553-559, 2007.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Quím. Nova**, v.25, n. 1, p. 45-61, 2002.
- PITANGA, F. J. G. Physical activity and plasmatic lipoproteins in adults male and female. **Rev. Bras. Ciênc. Mov.**, v. 9, 2001.
- QI, X.Y.; CHEN, W.J.; ZHANG, L.Q.; XIE, B.J; Mogrosides extracts from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals in vitro and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice. **Nutr. Res.**, v. 28, n.4, p. 278-284, 2008.
- RAUBER, C.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Pre-clinic toxicological evaluation of a phytotherapeutic containing *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) in Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2006.
- RIZZO, M.; KOTUR-STEVLJEVIC, J.; BERNEIS, K.; SPINAS, G.; RINI, G. B.; JELIC-IVANOVIC, Z.; SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA, V.; VEKIC. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. **Translational Res.**, 2009.
- ROCHA, J. T. **Atividade hipolipidêmica do disseleneto de difenila na hiperlipidemia induzida por triton WR-1339 em camundongos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.
- ROHDICH, F.; HECHT, S.; GARTNER, K.; ADAM, P.; KRIEGER, C.; AMSLINGER, S.; DUILIO ARIGONI, D.; BACHER, A.; EISENREICH, W. Studies on the non mevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein, **PNAS**, v. 99, n. 3, p. 1158–1163, 2002.
- SALA, P. C.; TORRINHAS, R. S.; HEYMSFIELD, S. B.; WAITZBERG, D. L. Type 2 diabetes mellitus: a possible surgically reversible intestinal dysfunction. **Obes. Surg.**, 2011.
- SAMY, R. P.; PUSHPARAJ, P. N.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A compilation of bioactive compounds from Ayurveda. **Bioinformation**, 2008.
- SANDHYA, V.G.; RAJAMOHAN, T. Beneficial Effects of Coconut Water Feeding on Lipid Metabolism in Cholesterol-Fed Rats. **J. Med. Food**, 2006.
- SARAVANAN, R.; VISWANATHAN, P.; PUGALENDI, K.V. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. **Life Sci.**, 2006.

SATO, H.; GENET, C.; STREHLE, A.; THOMAS, C.; LOBSTEIN, A.; WAGNER, A.; MIOSKOWSKI, C.; AUWERX, J.; SALADIN, R. Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 362, n. 4, p.793-798, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis:UFSC, 2003.

SEEBALLUCK, F.; LAWLESS, E.; ASHFORD, M. B.; O'DRISCOLL, C. M. Stimulation of triglyceride-rich lipoprotein secretion by polysorbate 80: *in vitro* and *in vivo* correlation using caco-2 cells and a cannulated rat intestinal lymphatic model. **Pharm. Res.**, v. 21, n. 12, 2004.

SENEVIRATNE, K.N.; KOTUWEGEDARA, R.T.; EKANAYAKE, S. Serum cholesterol and triglyceride levels of rats fed with consumer selected coconut oil blends. **Int. Food Res. J.**, v. 18, n. 4, p. 1303-1308, 2011.

SHUKLA, P.; SRIVASTAVA, S.P.; SRIVASTAVA, R.; RAWAT, A.K.; SRIVASTAVA, A.K. PRATAP, R. Synthesis and antidyslipidemic activity of chalcone fibrates. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 2011.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v.106, n.2, p.171-176, 2000.

SIKKA, P.; KAPOOR, S.; BINDRA, V. K.; SHARMA, M.; VISHWAKARMA, P.; SAXENA, K. K. Statin intolerance: Now a solved problem. **J. Postgrad. Med.**, v. 57, n.4, p. 321-328, 2011.

SILVA, J. L. **Os efeitos do exercício resistido no metabolismo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e da lipoproteína de alta densidade (HDL), utilizando uma nanoemulsão semelhante a LDL**. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVA, J. P. A.; SAMPAIO, L. S.; OLIVEIRA, L. S.; REIS, L. A. Plantas medicinais utilizadas por portadores de diabetes mellitus tipo 2 para provável controle glicêmico no município de Jequié-BA. **Rev. Saúde Com.**, v. 4, n. 1, p. 10-18, 2008.

SILVA, M. S.; ANTONIOLLI, A. R.; BATISTA, J. S.; MOTA, C. N. Plantas medicinais usadas nos distúrbios gastrointestinais no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 4, p. 815-829, 2006.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Rev. Bras. Pharmacogn.**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Departamento de Aterosclerose. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, supl. 1, p. 2-19, 2007.

SOUSA, A. G. P. **Associação entre TCF7L2 e outras variantes genéticas de risco para diabetes mellitus tipo 2 e doença cardiovascular.** Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SPORN, M.B.; LIBYY, K. T. YORE, M. M. FU, L. LOPCHUK, J. M. GRIBBLE, G. W. New synthetic triterpenoids: potent agents for prevention and treatment of tissue injury caused by inflammatory and oxidative stress. **J. Nat. Prod.**, v. 74, p. 537–545, 2011.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. H.; BERTOLAMI, M. C.; et al. IV Brazilian guideline for dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Department of atherosclerosis of brazilian society of cardiology. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, supl. 1, abr. 2007.

SY, G.Y.; CISSÉ, A.; NONGONIERMA, R.B.; SARR, M.; MBODJ, N.A.; FAYE, B. Hypoglycaemic and antidiabetic activity of acetonic extract of *Vernonia colorata* leaves in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.98, n.1-2, p.171-175, 2005.

SUDHAHAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vasc. Pharmacol.**, v. 46, n.6, p. 412-418, 2007.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEODORO, T.; ZHANG, L.; ALEXANDER, T.; YUE, J.; VRANIC, M.; VOLCHUK, A. Oleonic acid enhances insulin secretion in pancreatic b-cells. **FEBS Lett.**, p. 582, 2008.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 9, p. 297–304, 2006.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia Popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm.**, v.15, n. 1, p. 115-121, 2006.

TRAKA, M. H.; MITHEN, R. F. Plant science and human nutrition: challenges in assessing health-promoting properties of phytochemicals. **Plant Cell**, v. 23, n.2, p. 2483–2497, 2011.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Toxicological information of some herbal medicines used in Brazil. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 2, abr./jun. 2006.

VAN DEN DRIESSCHE, A. V.; EENKHOORN, V.; VAN GAAL, L.; DE BLOCK, C. Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. **J. Med.**, v. 67, 2009.

VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H.B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev. Bras. Pharmacogn.**, v.17, n.4, p. 583-591, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Braz. J. Pharmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 308-313, abr./jun. 2008.

VEIGA JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants: safe cure? **Quím. Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, T. C. SU, Y. P. HSU, T. Y. YANG, C. C. LIN, C. C. 28-Day oral toxicity study of the aqueous extract from spider brake (*Pteris multifida* Poiret) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 2007.

WEN, X.; SUN, H.; LIU, J.; CHENG, K.; ZHANG, P.; ZHANG, L.; HAO, J.; ZHANG, L.; NI, P.; ZOGRAPHS, S. E.; LEONIDAS, D. D.; ALEXACOU, K. M.; GIMISIS, T.; HAYES, J. M.; OIKONOMAKOS, N. G. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 3540–3554, 2008.

WILSON, T.A.; NICOLOSI, R.J.; WOOLFREY, B.; KRITCHEVSKY, D. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. **J. Nutr. Biochem.**, v. 18, p. 105–112, 2007.

XAVIER, H. T. Pharmacology of fibrates. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 85, 2005.

XIE, W.; WANG, W.; SU, H.; XING, D.; CAI, G.; DU, L. Hypolipidemic Mechanisms of *Ananas comosus* L. Leaves in Mice: Different From Fibrates but Similar to Statins. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 103, n. 3, p.267-274, 2007.

YANG, R.; LE, G.; LI, A.; ZHENG, J.; SHI, Y. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. **Nutrition**, v. 22, 2006.

YANG, R.L. SHI, Y.H. HAO, G. LI, W. LE, G.W. Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index. **J. Clin.Biochem. Nutr.** 2008.

YOGESHWARI, P.; SRIRAM. D. Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Curr. Med. Chem.**, v.12, n. 6, p.657-666, 2005.

YOSHIZUMI, K.; HIRANO, K.; ANDO, H.; HIRAI, Y.; TSUJI, T.; TANAKA, T.; SATOUCHI, K.; TERAOKA, J. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus*

and their inhibitory activity on pancreatic lipase. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 335–341, 2006.

ZHANG, C.; JIN, Y.; LIU, T.; LIU, F.; ITO, T. Hypertriglyceridemia in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits was associated with increased production and reduced catabolism of very-low-density lipoproteins. **Pathobiology**, v. 76, p. 315–332, 2009.

ZHANG, Y. N.; ZHANG, W.; HONG, D.; SHI, L.; SHEN, Q.; LI, J. Y.; LI, J.; HU, L. H. Oleanolic acid and its derivatives: new inhibitor of protein tyrosine phosphatase 1B with cellular activities. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 8697–8705, 2008.

ZHU, X.; ZHANG, W.; ZHAO, J.; WANG, J.; QU, W. Hypolipidaemic and hepatoprotective effects of ethanolic and aqueous extracts from *Asparagus officinalis* L. by-products in mice fed a high-fat diet. **J. Sci. Food Agric.**, 2010.

ZUCO, V.; SUPINO, R.; RIGHETTI, S. C.; CLERIS, L.; MARCHESI, E. PASSERINI, C. G.; FORMELLI, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett.**, v. 175, p. 17–25, 2002.