

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE SAÚDE BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA

RAFAELLA MORAES REGO DE SOUSA COELHO

**Efeitos anti-hiperglicemiante e anti-hiperlipemiante do extrato rico em polifenóis  
das folhas de *S. cumini* em ratos diabéticos**

**São Luís  
2017**

**RAFAELLA MORAES REGO DE SOUSA COELHO**

Artigo Científico apresentado ao Curso de Medicina da  
Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do  
grau de Médica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes.

**São Luís**  
**2017**

**RAFAELLA MORAES REGO DE SOUSA COELHO**

**Efeitos anti-hiperglicemiante e anti-hiperlipemiante do extrato rico em polifenóis  
das folhas de *S. cumini* em ratos diabéticos**

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)**

---

**Profa. Dra. Germana Freire Rocha Caldas (Examinadora)**

---

**Profa. Ms. Samira Abdalla da Silva (Examinadora)**

---

**Prof. Ms. Jonas Rodrigues Sanches (Examinador)**

*À minha avó Adma e meu avô Paulo, pela dedicação*

*À minha família, pelo amor que sempre me deram*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua força onipotente em minha vida.

Aos meus avós, Adma e Paulo, os quais sempre depositaram em mim uma confiança incondicional, assim como me amaram, me ensinaram valores e me orientaram nos momentos mais difíceis da minha trajetória.

Aos meus pais, Crystiane e Palmério, por me permitirem o dom da vida e estarem comigo, mesmo à distância, apoiando minhas decisões.

Aos meus tios, César, Leide, Wanda, José Carlos e Paulo Filho, que, à sua cada maneira, me permitiram viver o conceito de família.

Ao meu irmão, Netto, pelo companheirismo em momentos decisivos.

Ao professor Marcus Paes, meu orientador da ciência e da vida. Um cientista que se tornou amigo e buscou comigo as alternativas para minha formação acadêmica. Muito obrigada.

À Vinycius, meu “suborientador”, o qual teve paciência e me ensinou uma parte do que sei sobre a arte de fazer ciência.

À Victor, que compartilhou comigo esses momentos de estudo e esteve à me incentivar e acreditar no meu potencial.

Ao Lefisio, por compartilharem comigo momentos de lazer e de muito trabalho e ensino. Por estarem comigo nos meus experimentos, ajudando e orientando com a sabedoria dos mais experientes. Vocês foram decisivos.

À colaboração de Tiago da Silva Teófilo, do Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Maranhão, e André Vale, do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer, por suas análises histológicas.

Aos meus amigos e amigas, antigos e conquistados nesses 6 anos de curso, que me acolhem e vivem comigo meus bons e maus momentos. Vocês são uma fortaleza fora de casa.

*“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação”.*

(John Dewey)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>08</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>09</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>11</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>23</b>

## RESUMO

A síndrome metabólica (SM) é um dos mais importantes e crescentes problemas de saúde pública do mundo. É caracterizada pela presença de ao menos 03 dos seguintes fatores: hipertensão, dislipidemia, obesidade, resistência insulínica e hiperglicemia de jejum. Sua prevalência tem aumentado drasticamente nos últimos anos e vem associada com aumento do risco de desenvolver diabetes mellitus (DM) e doenças cardiovasculares. A heterogeneidade dos seus fatores de risco, assim como dos tratamentos farmacológicos, fez da SM e do DM focos de intensa investigação científica. Portanto, este trabalho busca analisar os efeitos do extrato rico em polifenóis (ERP) das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre o perfil glicolipídico e morfologia histológica pancreática de ratos com diabetes induzido com aloxana. Para isso, ratos Wistar com 60 dias de vida foram separados em 03 grupos: ALX, o qual foi tratado com água durante todo o experimento; ALX – P, o qual recebeu ERP (50 mg/kg/dia, v.o.) do 7º ao 14º dia de experimento; e ALX – PP, o qual recebeu ERP (50 mg/kg/dia, v.o.) ao longo dos 14 dias de experimento. A glicemia de jejum foi analisada nos dias 0, 4, 7, 10 e 14. A indução foi realizada no 7º dia via injeção única de aloxana (150 mg/kg, i.p.). No 15º dia os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e órgãos. A administração de aloxana aumentou em mais de 290% a glicemia dos animais ALX, efeito este atenuado no grupo ALX – P e mais ainda no grupo ALX – PP. A administração do ERP preveniu a elevação do triglicérido e colesterol total séricos dos animais ALX-P e ALX-PP em relação ao grupo ALX. Notavelmente, os níveis séricos do HDL do grupo ALX – PP em relação ao grupo ALX estavam duplicados. O índice TyG, indicador de resistência insulínica, diminuiu nos grupos ALX – P e ALX – PP em comparação ao grupo ALX. Na análise histológica foram observados perda da arquitetura e do número das ilhotas pancreáticas, diminuição do diâmetro e infiltrado leucocitário no grupo ALX, efeitos marcadamente atenuados nos animais ALX – P e ALX – PP. Tais efeitos parecem estar relacionados à composição polifenólica do ERP, cuja caracterização por HPLC-MS demonstrou predomínio de compostos derivados de miricetina.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*, síndrome metabólica, *diabetes mellitus*, aloxana.

## ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) is one of the most important and growing public health problems in the world. It is characterized by the presence of a minimum of 03 of the following factors: hypertension, dyslipidemia, obesity, insulin resistance and fasting hyperglycemia. Its prevalence has increased dramatically in recent years and is associated with increased risk of developing diabetes mellitus (DM) and cardiovascular disease. The heterogeneity of its risk factors, as well as the pharmacological treatments, made SM and DM foci of intense scientific investigation. Therefore, this work aims to analyze the effects of the polyphenol rich extract (PRE) of leaves of *Syzigium cumini* (L.) Skeels on the glycolipid profile and histological pancreatic morphology of rats with alloxan-induced diabetes. For this, 60 day old Wistar rats were separated into 03 groups: ALX, which was treated with 0.9% NaCl throughout the experiment; ALX - P, which received PRE (50 mg / kg / day, o. v.) from the 7th to the 14th day of the experiment; and ALX-PP, which received PRE (50 mg / kg / day, o.v.) over the 14 days of experiment. Fasting glycemia was analyzed on days 1, 4, 7, 10 and 14. Induction was performed on day 7 via single injection of alloxan (150 mg / kg, i.p.). On the 15th day the animals were euthanized for collection of blood and organs. The administration of alloxan increased the glycemia of ALX animals by more than 290%, an effect that was attenuated in the ALX - P group and even more so in the ALX - PP group. Administration of PRE prevented elevation of serum triglyceride and total cholesterol in ALX-P and ALX-PP animals compared to ALX group. Notably, serum HDL levels of the ALX-PP group compared to the ALX group were doubled. The TyG index, an indicator of insulin resistance, decreased in the ALX - P and ALX - PP groups compared to the ALX group. Histological analysis revealed loss of architecture and number of pancreatic islets, decreased diameter and leukocyte infiltrate in the ALX group, markedly attenuated effects on ALX - P and ALX - PP animals. These effects seem to be related to the polyphenolic composition of PRE, whose characterization by HPLC-MS showed a predominance of myricetin-derived compounds.

Key words: *Syzigium cumini*, metabolic syndrome, *diabetes mellitus*, alloxan.

## 1. Introdução

A síndrome metabólica (SM) tornou-se um importante e crescente problema de saúde pública em todos os continentes (Kaur, 2014). A prevalência da SM tem aumentado rapidamente nos últimos anos (Singh and Kari, 2013), além do que, está associada a um aumento de cinco vezes no risco de *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e duas vezes no risco de desenvolver doença cardiovascular (DCV) (Kassi et al., 2011; Kaur, 2014). Em razão disso, a Federação Internacional de Diabetes harmonizou fatores metabólicos, fisiológicos, bioquímicos e clínicos, de modo a definir a SM como uma reunião de pelo menos três das seguintes disfunções: obesidade, particularmente a obesidade central, resistência insulínica (RI); hipertensão, hiperglicemia de jejum e dislipidemia (Alberti et al., 2009).

O DM2 está associado à elevação dos níveis sanguíneos de glicose e distúrbios do metabolismo lipoprotéico e de carboidratos. Essas anormalidades podem resultar tanto da deficiência de insulina, da superprodução de glicose a nível hepático ou da resistência insulínica, cerne da SM. Anormalidades no perfil glico-lipídico são as complicações mais comuns nos pacientes diabéticos, sendo que aqueles com resistência à insulina são mais propensos à hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (Krauss, 2004). Embora intervenções comportamentais, como dieta e exercício físico, possam melhorar a dislipidemia diabética, para a maioria dos pacientes a terapia farmacológica é necessária para alcançar os objetivos do tratamento (Kassi et al., 2011; Krauss, 2004), o que mantém em alta a busca por novos agentes terapêuticos.

A Organização Mundial de Saúde estima que 4 bilhões de pessoas usa alguma planta medicinal para cuidados primários da saúde (Gossell-Williams et al., 2006). Os fitoterápicos despertam interesse particular por possuírem grande diversidade químico-estrutural, baixa toxicidade e alta viabilidade econômica, tornando-se assim potenciais ferramentas terapêuticas (Auddy et al., 2003; Sharma et al., 2003). *Syzygium* é um dos maiores gêneros da família Myrtaceae, o qual abrange mais de 1100 espécies, dentre as quais destaca-se o *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Esta espécie é popularmente conhecida como jambolão, ameixa preta, jamun, amora preta indiana, ameixa roxa, dentre outras denominações e possui como sinônimas: *Eugenia jambolana* Lam, *Syzygium jambolana* DC., *Calypranthes jambolana* Willd (Ayyanar and Subash-Babu, 2012).

Diferentes partes do *S. cumini* são utilizadas como alternativa terapêutica para o tratamento de diversas enfermidades, tendo potencial hipoglicemiante, antihiperlipidêmico, antioxidante, antiinflamatório, antibacteriano, etc (Chagas et al., 2015; Srivastava and Chandra, 2013). Em particular, as folhas possuem flavonóides glicosilados, ácidos fenólicos e taninos, compostos propostos como os responsáveis pela promissora atividade anti-hiperglicemiante demonstrada em estudos clínicos e experimentais (Prince et al., 2004). Em trabalho recente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato hidroalcoólico bruto das folhas de *S. cumini* atenua a SM em ratos MSG-obesos através de uma dupla ação de melhoramento da RI e de modulação da secreção de insulina (Sanches et al., 2016). Desta forma, no presente trabalho, buscamos avaliar a ação de um extrato rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* sobre a glicemia e outros parâmetros metabólicos de ratos com diabetes induzido por aloxana.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Coleta do Material botânico**

Folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram coletadas diretamente de espécimes localizados no Campus da Universidade Federal do Maranhão (São Luís – MA) e autenticadas no Herbário MAR do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão, sob número de catalogação 4573.

### **2.2. Preparação do extrato rico em polifenóis das folhas**

Folhas secas e pulverizadas de *S. cumini* foram maceradas com etanol 70% e hidromódulo 1:6 sob agitação contínua por 24 horas à temperatura ambiente. O macerado foi filtrado em papel filtro e o pó resultante da filtração foi novamente resubmetido a dois outros ciclos de maceração – filtração. No total, foram realizados 03 ciclos conforme descrito. Os extratos foram agrupados e centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporador para obter-se o extrato hidroalcoólico bruto (EHB), o qual foi submetido à partição com clorofórmio (1:1 v/v, 3x). A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (1:1 v/v, 3x), e a fração de acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador e liofilizada, produzindo-se o extrato rico em polifenóis (ERP), o qual foi utilizado neste estudo (Sharma, B. et al., 2008).

### **2.3. Determinação do perfil polifenólico por HPLC-MS**

O cromatógrafo (LC-20A Prominence, Shimadzu) equipado com autoinjeter e detector SPD-20A/UV-Vis foi usado para separação dos polifenóis. As análises foram carreadas utilizando a coluna analítica Phenomenex Luna C-18 (250 x 4.6 mm – 5 µm). Antes da corrida, os extratos foram filtrados (0,45 µm, Milipore®) e dissolvidos no mesmo solvente utilizado para a extração. Os solventes foram desgaseificados usando banho de ultrassom. A fase móvel consistia em água acidificada com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B) de acordo com o seguinte gradiente de eluição: 0-30 min, 5% B; 30-70 min, 5%-30% B; 70-60 min, 30%-70% B, 60-90 min, 70-100% B; taxa de fluxo 1 mL/min; volume injetado 25 µL; temperatura do forno 40 °C; detecção em 254 nm. O mesmo programa de gradiente foi utilizado para o HPLC-UV-ESI-MS/MS.

O cromatógrafo (LC-10AD, Shimadzu) equipado com um detector UV-Vis foi acoplado a um espectrômetro de massas (Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics), com analisador tipo íon trap quadrupolo em modo tandem, com ionização por eletronebulização (electrospray ionization, ESI). As condições de ionização foram as seguintes: voltagem de electrospray com fonte de íons a 40 V, um potencial de 4,0 kV e temperatura a 320°C. Hélio ultrapuro (He) foi usado como gás de colisão e nitrogênio (N<sub>2</sub>) como gás de nebulização. A dessolvatação foi facilitada utilizando uma corrente de fluxo de 7,0 L/min. As análises foram realizadas no modo full scan, com ionização negativa, na faixa de 100 a 3000 *m/z*. Os dados de tempo de retenção, a massa do íon molecular e seus fragmentos foram utilizados para identificação dos compostos por análise comparativa com a literatura.

### **2.4. Animais e desenho experimental**

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, var. Wistar Hannover, com idade de 60 dias. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, com até cinco animais cada, mantidos temperatura de 21 ± 2 °C, ciclo claro-escuro de 12 horas, além de água e ração *ad libitum*. Após aclimação de uma semana, os animais foram divididos aleatoriamente em 03 grupos, os quais foram acompanhados por 14 dias. No 7º dia de acompanhamento, após jejum de 12 horas, os animais de todos os grupos receberam injeções de aloxana monohidratada (150 mg/kg; *i.p.*; Sigma Chem. CO., St Louis, USA) para indução do diabetes (Lenzen, 2008). Para

prevenir hipoglicemia fatal resultante da liberação rebote de insulina, foi fornecida água glicosada a 10% imediatamente após a indução e mantida por um período de 12 horas. A alimentação foi reintroduzida uma hora após a indução.

Tendo como base a indução do diabetes no 7º dia de acompanhamento, os grupos experimentais foram os seguintes:

ALX: Ratos diabéticos tratados com NaCl 0,9% (1 mL/Kg/dia, v.o., n=9) durante 14 dias;

ALX-P: Ratos diabéticos tratados com ERP (50 mg/kg/dia, v.o., n=14) durante os 07 dias posteriores à indução;

ALX-PP: Ratos diabéticos tratados com ERP (50 mg/kg/dia, v.o., n=14) durante 14 dias, ou seja, os 07 dias anteriores e posteriores à indução.

Durante todo o período experimental, o peso dos animais foi aferido todos os dias. Nos dias 1, 4, 7, 10 e 14, após jejum de 12 h, foram coletadas amostras de sangue periférico por punção da veia caudal para aferição da glicemia com fita reagente (Accu-Check Active, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Ao final do experimento, os animais foram postos em jejum de 12 h, anestesiados e eutanasiados por exsanguinação. Amostras de sangue foram coletadas por punção da artéria aorta e o soro foi utilizado para determinação das concentrações de triglicerídeos, colesterol total e colesterol - HDL. Os pâncreas foram coletados, pesados e apropriadamente armazenados para posterior avaliação histológica. Todos os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA-UFMA), sob número de protocolo 16/13.

### ***2.5. Avaliação do perfil lipídico e cálculo do Índice TyG***

Os níveis séricos de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e colesterol HDL foram mensurados por métodos enzimáticos através de kits comerciais (Guo et al., 2006). Para estimação da resistência à insulina, foi calculado o índice TyG pela fórmula:  $TyG = \ln ([TG \text{ (mg/dL)}] \times [glicose \text{ (mg/dL)}] / 2)$  (Simental-Mendia et al., 2008).

### ***2.6. Avaliação histopatológica do pâncreas***

Após pesagem, amostras do pâncreas de cada animal foi fixada em paraformaldeído 10% por 24h e posteriormente embebidos em parafina para serem seccionados em cortes sólidos de 5mm de espessura. As seções foram em seguida coradas com hematoxilina e eosina e analisadas qualitativamente sob microscópio óptico (Sun et al., 2008).

### **2.7. Análise estatística**

Os dados foram expressos como médias  $\pm$  EPM. As comparações estatísticas foram feitas por análise de variância unidirecional (ANOVA). Os resultados com valores de  $p$  menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

## **3. Resultados**

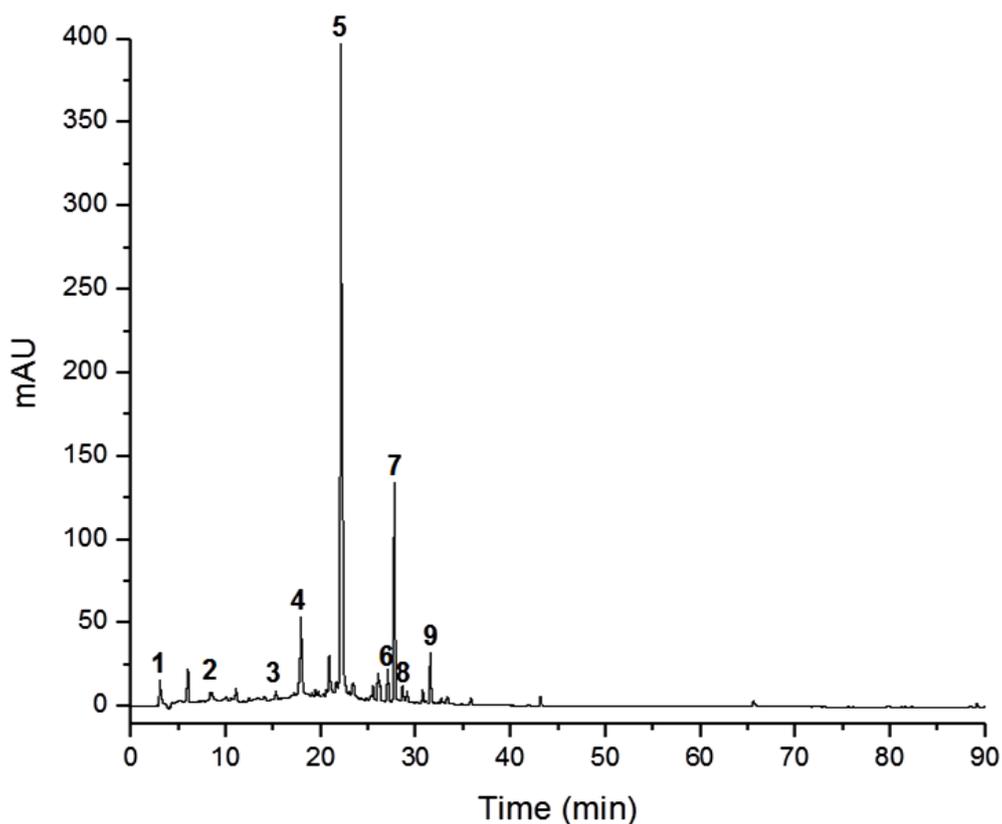
### **3.1. Caracterização do perfil polifenólico do ERP por HPLC-MS**

A caracterização por HPLC-MS do perfil polifenólico do ERP permitiu a identificação de nove compostos pertencentes às subclasses dos taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e flavonoides (flavonois). A Figura 1 apresenta o perfil cromatográfico onde estão identificados nove picos cujos dados espectrais foram utilizados para identificação por tentativa dos compostos fenólicos apresentados na Tabela 1. Os picos 1-3 são pertencentes à classe dos taninos hidrolisáveis, enquanto os picos 4-9 foram caracterizados como flavonois glicosilados derivados da miricetina (Tabela 1).

O pico 1 de  $[M-H]^-$  em  $m/z$  783 produziu íons fragmentos com  $m/z$  481, 301, 275 em  $MS^2$  que permitiram identificá-lo como sendo o di-hexahidroxi-difenol-glicose (di-HHDP glicose), polifenol já identificado nos frutos do Araçá (*Psidium guineense*) (Gordon et al., 2011), no caule de *Quercus suber* (Fernandes et al., 2011), além de blackberries (Hager et al., 2008) e strawberries (Seeram et al., 2006). O composto 2 apresentou  $[M-H]^-$  com  $m/z$  611 e íon fragmento de  $m/z$  305 ( $MS^2$ ) compatível com a ocorrência de (-)-epigallocatequina (Backoma et al., 2015). O pico 3 corresponde à molécula de HHDP-digaloilglicose com  $[M-H]^-$  em  $m/z$  785 e íons filhos com  $m/z$  615, 483, 301 em  $MS^2$ , cujos isômeros já foram identificados no gênero *Eucalyptus* (Santos et al., 2013). O  $[M-H]^-$  com  $m/z$  631, gerado a partir do pico 4, apresentou íons

fragmentos com  $m/z$  479, 317 em  $MS^2$  característicos da molécula de miricetina-3-O-(6" galoil) galactose, segundo caracterização anterior (Simirgiotis, 2013).

O pico 5 produzido a partir do íon pai com  $m/z$  463 gerou íon filho com  $m/z$  305 ( $MS^2$ ) indicando a ocorrência de miricetina-3-O-raminose (Hayder et al., 2008). Os picos 6-8 também foram identificados como isômeros da miricetina desoxihexosídeo acilada porque apresentaram íon pai com  $m/z$  505 e íons fragmentos com  $m/z$  316 ( $MS^2$ ). Estes compostos foram previamente reportados para os frutos e folhas de *Syzygium cumini* (Gordon et al., 2011). O pico 9 apresentou íon pai com  $m/z$  519 gerando íons fragments com  $m/z$  331, 315 ( $MS^2$ ) indicando a presença de metilmiricetina desoxihexosídeo acilada (Gordon et al., 2011).



**Figura. 1.** Separação de compostos fenólicos do Extrato Rico em Polifenóis (ERP) das folhas de *Syzygium cumini* por HPLC em 254 nm. Os picos numerados correspondem aos compostos submetidos à tentativa de identificação descritos na Tabela 1.

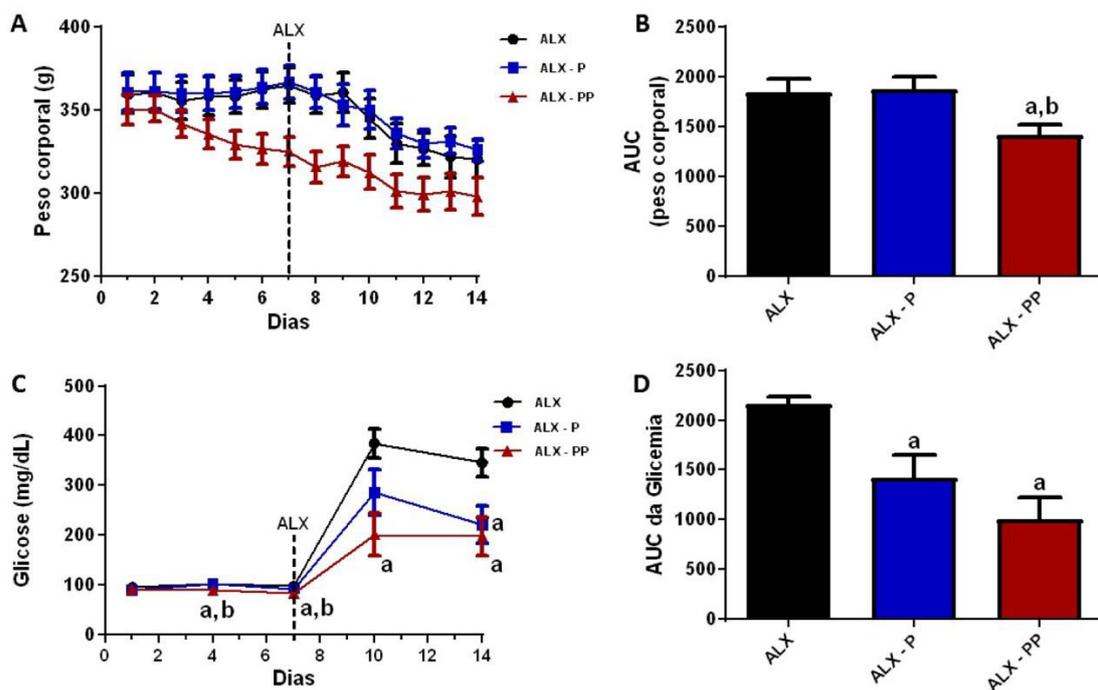
**Tabela 1.** Caracterização de compostos fenólicos do Extrato Rico em Polifenóis (ERP) das folhas de *Syzygium cumini* por HPLC-MS

Pico	t <sub>R</sub> (min)	Composto	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	2 [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS2 (m/z)	Referências
1	3.4	di-HHDP glicose	783		481, 301, 275	(1, 2, 3, 4)
2	8.9	(-)-epigallocatequina	611		305	(5)
3	15.7	HHDP digaloilglicose	785		615, 483, 301	(1, 7, 8)
4	18.4	miricetina-3-O-(6''galoil) galactose	631		479, 317	(6)
5	22.9	miricetina 3-O-raminose	463	927	317, 178	(6)
6	27.6	miricetina desoxihexosídeo acilada	505		316	(1)
7	28.3	miricetina desoxihexosídeo acilada	505		316	(1)
8	28.4	miricetina desoxihexosídeo acilada	505		316	(1)
9	32.2	metilmiricetina desoxihexosídeo acilada	519		331, 315	(1)

(1) (Gordon et al., 2011); (2) (Fernandes et al., 2011) (3) (Hager et al., 2008); (4) (Seeram et al., 2006); (5) (Backoma et al., 2015); (6) (Simirgiotis, 2013) (7) (Wu et al., 2012) (8) (Boulekbache-Makhlouf et al., 2010)

### 3.2. ERP reduz a hiperglicemia induzida por aloxana

O ERP (50 mg/kg/dia) promoveu perda de peso no grupo ALX-PP de  $350,1 \pm 7,48\text{g}$  para  $325 \pm 7,69\text{g}$  quando administrado previamente à indução do diabetes com aloxana (Figura 2A e B). Porém, não preveniu nem potencializou a perda de peso resultante da indução do diabetes, a qual reduziu o peso de todos os grupos experimentais. A administração de aloxana elevou a glicemia de jejum dos animais ALX em 291,74%, variando de  $98,22 \pm 4,66\text{ mg/dL}$  para  $384,77 \pm 29,15\text{ mg/dL}$  72 horas após a mesma (Figura 2C). Nos grupos tratados com ERP, este aumento foi atenuado em 32,48% nos animais ALX-P, e 41,33% nos animais ALX-PP,  $p < 0,05$ . Ao final do período de tratamento, os animais ALX tiveram glicemia média final de  $346,33 \pm 27,89\text{ mg/dL}$ , enquanto nos ALX-P era  $221,64 \pm 38,3\text{ mg/dL}$  e nos ALX-PP  $197,92 \pm 38,54\text{ mg/dL}$ . Esses resultados demonstram que o tratamento com ERP, tanto previamente quanto posteriormente à administração da aloxana, atenuam seu efeito hiperglicemiante, possivelmente por reduzir os danos oxidativos da mesma.



**Figura 2.** Efeitos do extrato rico em polifenóis de folhas de *S. cumini* sobre o peso corporal e glicemia de jejum de ratos com diabetes induzido por aloxana. A glicemia capilar em jejum foi verificada nos dias 01, 04, 07, 10 e 14. No 7º dia houve a indução do diabetes com Aloxana (150 mg/kg, i.p). Os animais que apresentaram perda de peso e elevação da glicemia foram considerados induzidos. ALX: Controle diabético, n=09; ALX-P: Tratamento com ERP (50 mg/kg/dia) após indução do diabetes, n=14; ALX - PP: Tratamento com ERP (50 mg/kg/dia) antes e após indução do diabetes, n=14. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM e foram submetidos a análise de variância, one-way ANOVA, para um nível de significância de 5%,  $p < 0,05$ . <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs ALX; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs ALX-P.

### ***3.3. ERP previne o desenvolvimento de dislipidemia induzida por aloxana***

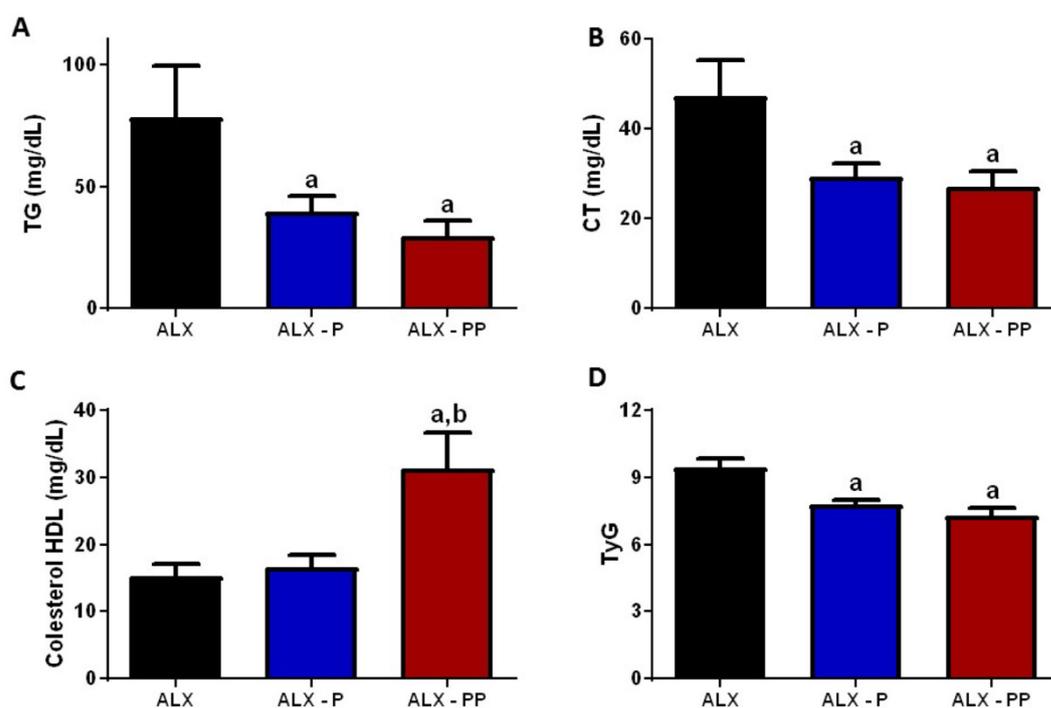
A administração do ERP preveniu a elevação do TG sérico dos animais ALX-P e ALX-PP, cujos níveis foram 49,3% e 62,61% menores que os detectados nos animais ALX ( $39,67 \pm 6,33$  mg/dL;  $29,26 \pm 6,76$  mg/dL e  $78,24 \pm 21,18$  mg/dL, respectivamente, Figura 3A). Efeito semelhante foi observado sobre os níveis séricos de CT, os quais foram reduzidos de  $47,18 \pm 7,97$  mg/dL nos animais ALX, para  $29,11 \pm 3,09$  mg/dL e  $29,96 \pm 3,53$  mg/dL, nos animais ALX-P e ALX-PP, respectivamente (Figura 3B). Por outro lado, os dados da Figura 3C mostram que o tratamento prévio com o ERP duplicou os níveis séricos de colesterol HDL dos animais ALX-PP ( $31,17 \pm 5,42$  mg/dL) quando comparados ao grupo ALX ( $15,28 \pm 1,91$  mg/dL), efeito não observado naqueles animais tratados apenas após a indução do diabetes (ALX-P:  $16,61 \pm 1,87$  mg/dL).

Considerando que os níveis séricos em jejum de glicose e TG têm sido associados ao desenvolvimento de resistência hepática à insulina, foi calculado o Índice TyG para verificação desse parâmetro. Os dados da Figura 3D mostram que o TyG foi reduzido em 17,7% no grupo ALX-P e em 23,1% no grupo ALX-PP quando comparado ao grupo ALX,  $p < 0,05$ . Estes dados corroboram os dados de redução da glicemia nos animais ALX-P e animais ALX-PP quando comparados aos animais ALX, pois podem estar relacionados a uma melhora da sensibilidade periférica insulínica, especialmente hepática como sugerido por esses dados do TyG.

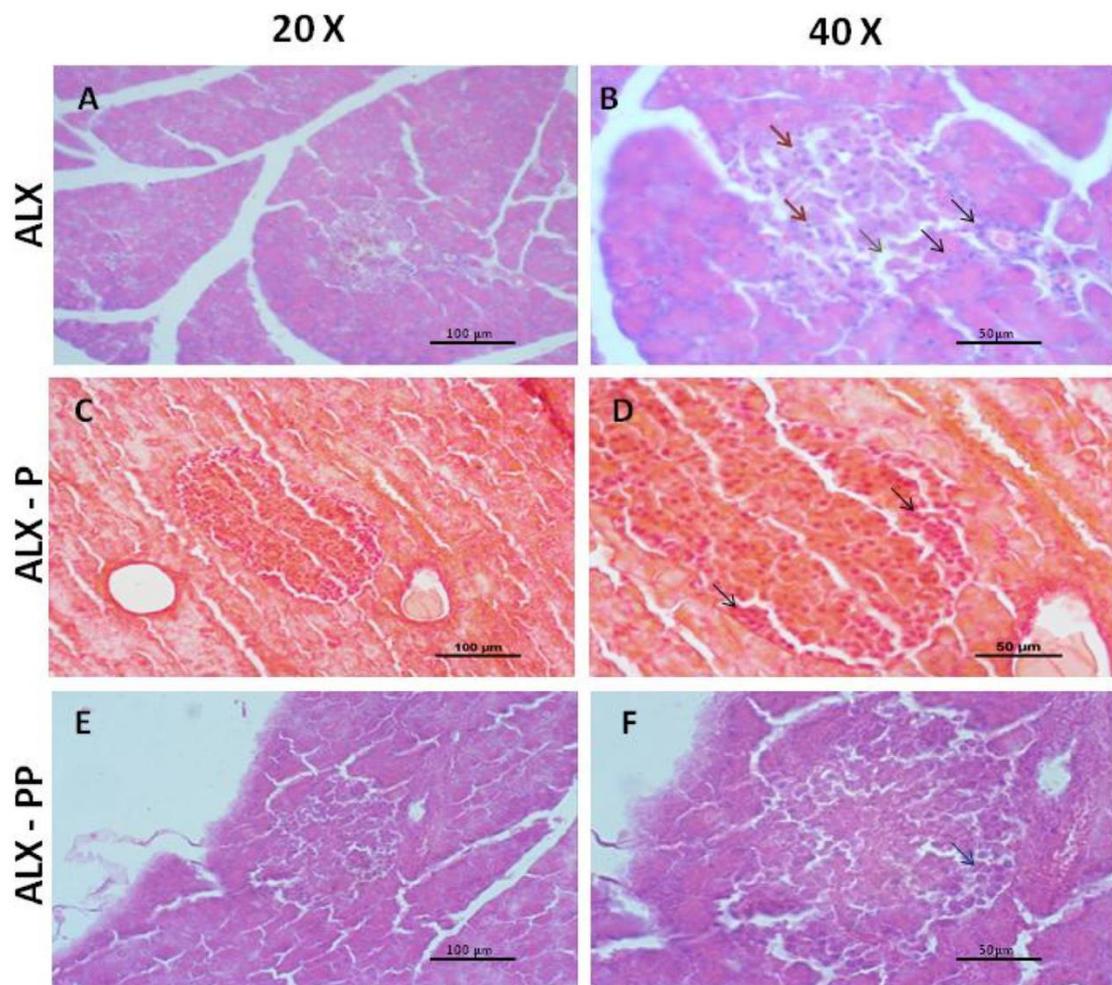
### ***3.4. ERP atenua os danos teciduais pancreáticos induzidos pela aloxana***

Não foram observadas diferenças significativas nos pesos dos pâncreas entre os grupos (dados não mostrados). A análise histológica qualitativa dos pâncreas dos animais ALX apresentaram áreas degeneradas com diminuição importante do número e diâmetro das ilhotas pancreáticas (Figura 4A e B). Nestas lâminas, destacam-se especialmente a perda da arquitetura da ilhota, com presença de infiltrado leucocitário (setas pretas), picnócitos nucleares em áreas periféricas (setas vermelhas), além de acidificação citoplasmática indicando dano e fibrose celular (setas verdes). Nos pâncreas do grupo ALX-P foram observadas ilhotas com arquitetura relativamente preservada, porém ainda com presença de células anucleadas e infiltrado leucocitário (setas pretas) (Figura 4C e D). Por outro lado, os pâncreas do grupo ALX-PP não

possuíam fibrose nem atrofia, com diâmetro e número regulares (Figura 4E e F). Além disso, foram identificadas células com núcleos proeminentes (seta verde), as quais são consideradas possíveis áreas de regeneração (Sharma and Singh, 2014). Ainda assim, algumas ilhotas apresentaram infiltrado leucocitário (Figura 4E e F).



**Figura 3. Efeitos do extrato rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* sobre o perfil lipídico e resistência à insulina de ratos com diabetes induzido por aloxana.** As concentrações séricas de triglicérides (TG), colesterol total (CT) e colesterol HDL foram aferidas no 8º dia após a indução do diabetes com Aloxana (150 mg/kg, i.p). Além disso, os valores de glicemia e trigliceridemia de jejum foram utilizados para cálculo do Índice TyG, o qual prediz a resistência insulínica dos animais. **ALX:** Controle diabético, n=09; **ALX-P:** Tratamento com ERP (50 mg/kg/dia) após indução do diabetes, n=14; **ALX-PP:** Tratamento com ERP (50 mg/kg/dia) antes e após indução do diabetes, n=14. Os dados são expressos como média ± EPM e foram submetidos a análise de variância, one-way ANOVA, para um nível de significância de 5%,  $p < 0,05$ . <sup>a</sup>  $p < 0,05$  vs ALX; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  vs ALX-P.



**Figura 4: Análise qualitativa dos efeitos do extrato rico em polifenóis das folhas de *S. cumini* sobre a histologia pancreática de ratos com diabetes induzido por aloxana.** Análise qualitativa das lâminas com especial atenção à arquitetura das ilhotas (painéis A, C e E, aumento 20x), presença de infiltrado leucocitário (setas pretas), picnócitos nucleares em áreas periféricas (setas vermelhas), acidificação citoplasmática indicativa de dano e fibrose celular (seta verde) e células com núcleo proeminente (seta azul). As imagens são representativas da análise de lâminas de, pelo menos, 3 animais por grupo. **ALX:** Controle diabético; **ALX-P:** Tratamento com ERP (50 mg/kg/dia) após indução do diabetes; **ALX - PP:** Tratamento com ERP (50 mg/kg/dia) antes e após indução do diabetes.

#### 4. Discussão

O DM2 é uma doença crônico-degenerativa de acometimento global, sendo que a redução da hiperglicemia diminui o risco de desenvolvimento de doenças microvasculares assim como suas complicações (Gaster and Hirsch, 1998). Terapias convencionais possuem limitações baseadas em alto custo, efeitos colaterais e falência secundária. Por outro lado, espera-se de produtos derivados de plantas medicinais uma eficácia similar sem as limitações encontradas em tratamentos farmacológicos antidiabetogênicos (Kim et al., 2006). Sendo assim, no presente estudo mostramos que o ERP melhora os quadros de hiperglicemia e hiperlipidemia induzidos pela aloxana, provavelmente por atenuar as ações citotóxicas deste composto sobre a estrutura e função pancreáticas.

A administração do ERP, seja anterior ou imediatamente posterior à indução do DM com aloxana, reduziu significativamente a magnitude do efeito hiperglicemiante deste composto. Neste caso, pareceu haver uma vantagem terapêutica no uso preventivo do extrato, pois houve diferença entre os dois grupos tratados, ALX-P e ALX-PP. Vários estudos tem investigado as ações anti-hiperglicemiantes do *S. cumini* em animais com DM induzido por aloxana, com relatos que remetem à década de 1940 (Wastl et al., 1947). No entanto, estes trabalhos relatam o uso das sementes (Pandey and Khan, 2002; Sharma et al., 2003), pele das sementes (Nair and Santhakumari, 1986) ou polpa do fruto (Sharma et al., 2006) da planta como matéria prima para tais estudos. Ao que nos parece, este é o primeiro relato da ação anti-hiperglicemiante de extrato das folhas de *S. cumini* neste modelo animal. Esta ação pode ser mediada pelos isômeros de miricetina identificados nos picos 6 – 9 do ERP, cuja ação hipoglicemiante tem sido atribuída ao aumento da expressão de GLUT-4 no tecido adiposo e músculo esquelético (Liu et al., 2007).

Existe uma relação bem estabelecida entre RI e dislipidemia. A RI leva à dislipidemia através de uma maior mobilização de ácidos graxos livres a partir de depósitos de gordura, aumentando a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG – CoA) redutase e diminuindo a atividade da lipoproteína lipase (LPL) (De Silva and Frayling, 2010). A administração do ERP diminuiu significativamente os níveis de TG e CT séricos nos animais ALX-P e ALX-PP, sendo estes resultados semelhantes aos observados em outros trabalhos (Sanches et al., 2016; Sharma et al., 2012). Além

disso, já foi demonstrado que extratos de *S. cumini* são capazes tanto de estimular a atividade da LPL (Sharma et al., 2012), quanto inibir a atividade da HMG-CoA redutase (Ravi et al., 2005; Sharma, Bhavna et al., 2008). Não menos importante, essas propriedades redutoras de colesterol e triglicérides também podem ser atribuídas à atividade antioxidante dos compostos polifenólicos identificados no ERP (Eshwarappa et al., 2014; Guo et al., 2006). Outro dado relevante, é que os animais ALX-PP apresentaram aumento significativo dos níveis de colesterol HDL, dado corroborado pelos achados de Sharma, Bhavna et al. (2008).

Apesar das evidências citadas acima, é necessário considerar o fato de que a ação diabetogênica da aloxana decorre principalmente do fato deste composto acumular-se rapidamente no citoplasma das células  $\beta$  pancreáticas, onde é reduzido ao seu análogo ácido dialúrico, iniciando ciclos de re-oxidação que amplificam o dano oxidativo celular causado pela mesma (Malaisse, 1982). Além disso, as células  $\beta$  apresentam naturalmente baixas taxas de expressão de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase Cu-Zn (SOD1), catalase e glutathione peroxidase (Lei and Vatamaniuk, 2011). Sendo assim, é possível especular que a composição polifenólica do ERP aqui descrita, tenha efeito estimulador das defesas antioxidantes das células  $\beta$  dos animais dos grupos ALX-P e ALX-PP, os quais apresentaram significativa melhora das características histológicas examinadas, especialmente com preservação da arquitetura e diâmetro das ilhotas de Langerhans. Efeito semelhante fora descrito anteriormente, porém para o extrato etanólico do pó das sementes de *S. cumini* (Singh and Gupta, 2007). Alguns derivados de miricetina, semelhantes aos descritos no ERP, foram descritos como importantes moduladores da expressão de genes envolvidos na defesa celular antioxidante, na apoptose e no reparo de danos ao DNA, além de demonstrar atividade antioxidante pela inibição da atividade da xantina oxidase, peroxidação lipídica e captura do radical DPPH (Hayder et al., 2008).

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo expandem os nossos achados sobre as ações anti-hiperglicemiantes e anti-hiperlipemiantes do extrato rico em polifenóis das folhas de *S. cumini*, uma vez que, suportam a hipótese de que os compostos bioativos presentes no ERP além de melhorar a resistência periférica à ação da insulina e modular a sua secreção pancreática (Sanches et al., 2016), também auxiliam na preservação da estrutura tecidual pancreática. No entanto, são ainda necessários estudos que busquem desvendar os mecanismos destes efeitos,

especialmente no sentido de identificar os compostos responsáveis por tais ações. Finalmente, a validação dos efeitos terapêuticos das folhas desta espécie são um importante passo para o manejo sustentável da mesma, posto ser esta uma fonte mais abundante que as sementes comumente usadas.

### **REFERÊNCIAS:**

- Alberti, K.G., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.C., James, W.P., Loria, C.M., Smith, S.C., Jr., 2009. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16), 1640-1645.
- Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., Tripathi, P.C., Seal, T., Mukherjee, B., 2003. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of ethnopharmacology* 84(2-3), 131-138.
- Ayyanar, M., Subash-Babu, P., 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2(3), 240-246.
- Boulekbache-Makhlouf, L., Meudec, E., Chibane, M., Mazauric, J.-P., Slimani, S., Henry, M., Cheynier, V., Madani, K., 2010. Analysis by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry of phenolic compounds in fruit of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Journal of agricultural and food chemistry* 58(24), 12615-12624.
- Chagas, V.T., Franca, L.M., Malik, S., Paes, A.M., 2015. *Syzygium cumini* (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. *Front Pharmacol* 6, 259.
- De Silva, N.M., Frayling, T.M., 2010. Novel biological insights emerging from genetic studies of type 2 diabetes and related metabolic traits. *Current opinion in lipidology* 21(1), 44-50.

- Eshwarappa, R.S., Iyer, R.S., Subbaramaiah, S.R., Richard, S.A., Dhananjaya, B.L., 2014. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. *BioImpacts* : BI 4(2), 101-107.
- Fernandes, A., Sousa, A., Mateus, N., Cabral, M., de Freitas, V., 2011. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. *Food Chemistry* 125(4), 1398-1405.
- Gaster, B., Hirsch, I.B., 1998. The effects of improved glycemic control on complications in type 2 diabetes. *Archives of internal medicine* 158(2), 134-140.
- Gordon, A., Jungfer, E., da Silva, B.A., Maia, J.G.S., Marx, F., 2011. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. *Journal of agricultural and Food Chemistry* 59(14), 7688-7699.
- Gossell-Williams, M., Simon, O.R., West, M.E., 2006. The past and present use of plants for medicines. *The West Indian medical journal* 55(4), 217-218.
- Guo, L., Hu, W.R., Lian, J.H., Ji, W., Deng, T., Qian, M., Gong, B.Q., 2006. Anti-hyperlipidemic properties of CM108 (a flavone derivative) in vitro and in vivo. *European journal of pharmacology* 551(1-3), 80-86.
- Hager, T.J., Howard, L.R., Liyanage, R., Lay, J.O., Prior, R.L., 2008. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(3), 661-669.
- Hayder, N., Bouhlel, I., Skandrani, I., Kadri, M., Steiman, R., Guiraud, P., Mariotte, A.-M., Ghedira, K., Dijoux-Franca, M.-G., Chekir-Ghedira, L., 2008. In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-o-galactoside and myricetin-3-o-rhamnoside from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray. *Toxicology in vitro* 22(3), 567-581.
- Kassi, E., Pervanidou, P., Kaltsas, G., Chrousos, G., 2011. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* 9, 48.
- Kaur, J., 2014. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract* 2014, 943162.
- Kim, S.H., Hyun, S.H., Choung, S.Y., 2006. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *Journal of ethnopharmacology* 104(1-2), 119-123.
- Krauss, R.M., 2004. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 27(6), 1496-1504.

- Lei, X.G., Vatamaniuk, M.Z., 2011. Two tales of antioxidant enzymes on beta cells and diabetes. *Antioxid Redox Signal* 14(3), 489-503.
- Lenzen, S., 2008. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 51(2), 216-226.
- Liu, I.M., Tzeng, T.F., Liou, S.S., Lan, T.W., 2007. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. *Life Sci* 81(21-22), 1479-1488.
- Malaisse, W.J., 1982. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochem Pharmacol* 31(22), 3527-3534.
- Nair, R.B., Santhakumari, G., 1986. Anti - diabetic activity of the seed kernel of *Syzygium cumini* linn. *Anc Sci Life* 6(2), 80-84.
- Pandey, M., Khan, A., 2002. Hypoglycaemic effect of defatted seeds and water soluble fibre from the seeds of *Syzygium cumini* (Linn.) skeels in alloxan diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 40(10), 1178-1182.
- Prince, P.S., Kamalakkannan, N., Menon, V.P., 2004. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of alcoholic *Syzygium cumini* seeds in alloxan induced diabetic albino rats. *Journal of ethnopharmacology* 91(2-3), 209-213.
- Ravi, K., Rajasekaran, S., Subramanian, S., 2005. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food Chem Toxicol* 43(9), 1433-1439.
- Sanches, J.R., Franca, L.M., Chagas, V.T., Gaspar, R.S., Dos Santos, K.A., Goncalves, L.M., Sloboda, D.M., Holloway, A.C., Dutra, R.P., Carneiro, E.M., Cappelli, A.P., Paes, A.M., 2016. Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats. *Frontiers in pharmacology* 7, 48.
- Santos, S.A., Vilela, C., Freire, C.S., Neto, C.P., Silvestre, A.J., 2013. Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from *Eucalyptus* wood. *Journal of Chromatography B* 938, 65-74.
- Seeram, N.P., Lee, R., Scheuller, H.S., Heber, D., 2006. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy. *Food Chemistry* 97(1), 1-11.
- Sharma, A.K., Bharti, S., Kumar, R., Krishnamurthy, B., Bhatia, J., Kumari, S., Arya, D.S., 2012. *Syzygium cumini* ameliorates insulin resistance and beta-cell

- dysfunction via modulation of PPAR, dyslipidemia, oxidative stress, and TNF- $\alpha$  in type 2 diabetic rats. *Journal of pharmacological sciences* 119(3), 205-213.
- Sharma, B., Balomajumder, C., Roy, P., 2008. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 46(7), 2376-2383.
- Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R., Roy, P., 2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food chemistry* 110(3), 697-705.
- Sharma, P., Singh, R., 2014. Effect of *Momordica dioica* fruit extract on antioxidant status in liver, kidney, pancreas, and serum of diabetic rats. *Pharmacognosy Res* 6(1), 73-79.
- Sharma, S., Nasir, A., Prabhu, K., Murthy, P., Dev, G., 2003. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 85(2), 201-206.
- Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., 2006. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 104(3), 367-373.
- Simental-Mendia, L.E., Rodriguez-Moran, M., Guerrero-Romero, F., 2008. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord* 6(4), 299-304.
- Simirgiotis, M.J., 2013. Antioxidant Capacity and HPLC-DAD-MS Profiling of Chilean Peumo (*Cryptocarya alba*) Fruits and Comparison with German Peumo (*Crataegus monogyna*) from Southern Chile. *Molecules* 18(2), 2061-2080.
- Singh, A.K., Kari, J.A., 2013. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 22(2), 198-203.
- Singh, N., Gupta, M., 2007. Effects of ethanolic extract of *Syzygium cumini* (Linn) seed powder on pancreatic islets of alloxan diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 45(10), 861-867.
- Srivastava, S., Chandra, D., 2013. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. *J Sci Food Agric* 93(9), 2084-2093.
- Sun, J.E., Ao, Z.H., Lu, Z.M., Xu, H.Y., Zhang, X.M., Dou, W.F., Xu, Z.H., 2008. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice. *Journal of ethnopharmacology* 118(1), 7-13.

Wastl, H., Boericke, G.W., Foster, W.C., 1947. Studies of effects of *Syzygium jambolanum* on alloxan-diabetic rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 75(1), 33-50.

Wu, S.-B., Dastmalchi, K., Long, C., Kennelly, E.J., 2012. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. *Journal of agricultural and food chemistry* 60(30), 7513-7525.

|