U F R J

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Nutrição Josué de Castro

AVALIAÇÃO DE INFUSOS DE FOLHAS DE INSULINA VEGETAL (*CISSUS SICYOOIDES* L.) DESIDRATADA EM RATOS *WISTAR* SADIOS E COM DIABETES *MELLITUS* INDUZIDA

Adriana da Silveira Leal

Rio de Janeiro

2013

U F R J

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Nutrição Josué de Castro

AVALIAÇÃO DE INFUSOS DE FOLHAS DE INSULINA VEGETAL (*CISSUS SICYOOIDES* L.) DESIDRATADA EM RATOS *WISTAR* SADIOS E COM DIABETES *MELLITUS* INDUZIDA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Gradução em Nutrição Humana, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Adriana da Silveira Leal

Orientador: Prof. Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur
Coorientadora: Profª Drª Andrea Pereira de Souza

Rio de Janeiro
2013

Leal, Adriana da Silveira

Avaliação de infusos de folhas de insulina vegetal (*cissus sicyooides* l.) desidratada em ratos *wistar* sadios e com diabetes *mellitus* induzida / Adriana da Silveira Leal. Rio de Janeiro: UFRJ, 2013.

Nº p: 54 f.:il.; 31cm;

Orientador: Armando U.O. Sabaa Srur

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2013.

Referências Bibliográficas: f. 56

1. *Cissus sicyoides* L. 2. Insulina vegetal. 3. Diabetes *melittus*. Tese I. Sabaa-Srur, Armando Ubirajara de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição III. Título.

Adriana da Silveira Leal

AVALIAÇÃO DE INFUSOS DE FOLHAS DE INSULINA VEGETAL (*CISSUS SICYOOIDES* L.) DESIDRATADA EM RATOS *WISTAR* SADIOS E COM DIABETES *MELLITUS* INDUZIDA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Nutrição Humana, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Avaliada em: _____

Profª Drª Maria Cristina Jesus Freitas (revisora)
Instituto de Nutrição Josué de Castro - UFRJ

Profº Drº Gilson Boaventura (titular)
Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro - UFF

Profª Drª Cláudia Cople (titular)
Instituto de Nutrição - UERJ

Profª Drª Mariana Catta-Preta Caiado Pereira (suplente externo)
Centro Universitário Augusto Motta e Centro Universitário Celso Lisboa

Profª Drª Sílvia Couto (suplente do Instituto de Nutrição Josué de Castro)
Instituto de Nutrição Josué de Castro – UFRJ

.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus “Rodolfos”.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por cercar-me de pessoas iluminadas e pacientes.

Ao meu marido Rodolfo por todos os momentos de alegrias e tristezas deste período, pela paciência, pelas palavras de incentivo e pelo seu amor.

Aos meus pais Maria Helena e João Antônio, por sempre acreditarem que eu poderia ser uma pessoa melhor, por terem me proporcionado a possibilidade de estudar. Amo muito vocês!

Ao meu magnífico orientador Profº Drº Armando Sabaa Srur, por ter insistido de que eu era capaz, por confiar, por me mostrar o exemplo de professor orientador, a paciência e atenção que sempre desprendeu quando solicitado, sua força de vontade, persistência e otimismo.

Aos meus irmãos Diego e Daiana, os meus cunhados Liliane e Felipe e aos docinhos da tia, Henry e Lucca, pelo fato de simplesmente existirem em minha vida.

A Mari por estar sempre de plantão para as minhas perguntas mais ridículas, por sempre acreditar que tudo isso iria dar certo. Minha amiga, muito obrigada!

Aos meus sogros Srº Cunha e Nádia, por preencherem um pouquinho o vazio que sinto de saudade da minha família.

A Adriana e sua família, por me tratarem como uma irmã e filha, pelo acolhimento e amizade.

As minhas amigas gaúchas: Ritinha e Marcinha, por fazerem parte da minha vida deixando-a mais alegre e “vermelhas”.

As minhas amigas cariocas: Fernanda Amorim, Giselle Oliveira, Alejandra Faúndez e Fabiane Toste, por estarem sempre disponíveis para um desabafo, uma risada boa e algumas lágrimas.

A Andrea Pereira, minha coorientadora por me ensinar a pesquisa com ética e incentivar a procura de novos produtos.

Aos meus colegas do Laboratório do “Fundão” Elaine, Samira, Thadia, Noemia, Thaís, Kelly por me ajudarem com as técnicas de algumas análises.

Aos meus colegas do Laboratório experimental da UFF: André, Carlos, Paulinha, Luis, Francisco e ao Profº Drº Gilson, por me acolher por meses, com muita atenção, por responder as minhas perguntas e aceitar os meus horários da “madrugada”.

Aos meus colegas do Laboratório da LITEB/Fiocruz: Jaqueline (disponibilidade “*full time*”), Aline (paciência de um monge) e Priscila, por estarem presente sempre que precisei.

A UNISUAM por ter possibilitado eu realizar mais esta etapa da minha vida acadêmica, agradeço as minhas coordenadoras dos cursos de Nutrição e Gastronomia (Fabiane e Giselle) e aos meus colegas (Mariana, Fernanda, Adriana, André, Elga, Ana Cláudia, Susana, Gisele, Paola) por sempre estarem dispostos a me ajudar.

A Drª Andrea Cordovil por disponibilizar seu pouco tempo para analisar e me ajudar com as lâminas de histologia.

Aos meus alunos que inspiram o meu crescimento como docente.

A todas as pessoas que estão no meu convívio, que de algum modo me ajudaram a realizar meu sonho.

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**11**
2	**JUSTIFICATIVA**	**13**
3	**REVISÃO DA LITERATURA**	**14**
3.1	***Cissus sicyoides* L.**	**14**
3.1.1	Classificação	**14**
3.1.2	Constituinte químico	**16**
3.1.3	Atividade hipoglicemiante da insulina vegetal	**16**
3.2	**Atividade antioxidante de plantas**	**18**
3.3	**Fitoterápicos**	**19**
3.4	**Diabetes *Mellitus***	**20**
3.4.1	Estresse oxidativo e Diabetes *Mellitus*	**22**
4	**OBJETIVOS**	**24**
4.1	**Objetivo geral**	**24**
4.2	**Objetivos específicos**	**24**
5	**MATERIAL E MÉTODO**	**25**
5.1	**Folhas**	**25**
5.2	**Manuseio de matéria-prima**	**25**
5.2.1	Higienização das folhas de insulina vegetal	**25**
5.2.2	Desidratação das folhas	**25**
5.2.3	Trituração, embalagem e armazenamento	**26**
5.3	**Experimentação animal**	**26**
5.3.1	Indução do diabetes	**27**
5.3.2	Preparo e oferta do infuso de insulina vegetal	**27**
5.3.3	Controle de ingestão	**28**
5.3.4	Controle de glicemia	**28**
5.3.5	Eutanásia	**28**
5.3.6	Processamento do sangue	**28**
5.3.7	Análise da catalase sérica	**29**
5.3.8	Análise histológica	**30**
5.3.8.1	Processamento de tecido	**30**
5.3.8.2	Microtomia e montagem dos cortes na lâmina	**30**
5.3.8.3	Desparafinização, re-hidratação, coloração e montagem	**30**

5.3.8.4	Interpretação das lâminas	**31**
5.4	**Análise estatística**	**31**
6	**RESULTADOS**	**32**
6.1	**Determinação química e física das folhas de insulina vegetal**	**32**
6.2	**Ingestão alimentar e eficiência alimentar**	**32**
6.3	**Massa corporal**	**32**
6.4	**Massa dos órgãos**	**33**
6.5	**Glicemia**	**33**
6.5.1	Glicemia Pré indução	**33**
6.5.2	Pós indução de Streptozotocina	**34**
6.5.3	Glicemia Final	**35**
6.5.4	Catalase	**35**
6.5.5	Avaliação Histológica	**37**
7	**DISCUSSÃO**	**38**
8	**CONCLUSÃO**	**43**
	REFERÊNCIAS	**44**
	ANEXO	**52**

RESUMO

LEAL, A.S; **Avaliação de infusos de folhas de insulina vegetal (*Cissus Sicyooides L.*) desidratada em ratos *Wistar* com Diabetes *Mellitus* induzida**. Rio de Janeiro, 2013.

O uso de plantas medicinais encontram-se em expansão em todo mundo em função do alto custo dos medicamentos industrializados, dos efeitos benéficos que lhes são creditados ou do próprio modismo. Estes efeitos atraem portadores de doenças degenerativas, como o diabetes *Mellitus* tipo II, sendo uma epidemia mundial. Inúmeras plantas são estudadas com o objetivo de auxiliar no tratamento do diabetes *Mellitus*, no Brasil podemos destacar a insulina vegetal (*Cissus sicyoides* L.). Esta dissertação tem por objetivo avaliar os infusos de folhas de insulina vegetal a 5% em ratos *Wistar* sadios e com Diabetes *Mellitus* induzida com streptozotocina. Foi coletada a planta no município do Rio de Janeiro, encaminhada ao INJC/UFRJ para ser higienizada, desidratada, moída e armazenada sob refrigeração. A parte experimental contou com 20 ratos, divididos em dois grupos (DM E NDM), onde foi induzida a diabetes por via intraperitoneal com o uso de Streptozotocina® e outro água destilada, antes da indução mensurou-se a glicemia dos animais e após três dias repetiu-se a mensuração para confirmar se os animais ficaram diabéticos, e foram formados quatro grupos (DM, DM5%, NDM, NDM5%). Após iniciou-se o tratamento com o infuso de folhas de insulina vegetal a 5% que foi administrada por 28 dias, neste período, foi verificado a massa corporal dos animais, a ingestão de ração e a glicemia em quatro pontos. O sacrifício foi realizado por super dosagem de Thiopental®, posteriormente foi coletado o sangue para processamento e análise da catalase. Os órgãos (coração, rim e fígado) foram retirados para análise histológica. Os resultados na glicemia dos animais ao final do experimento, demonstrou claramente o efeito hipoglicemiante significativo do chá de insulina vegetal a 5% em animais diabéticos (DM 5%) em comparação ao grupo controle (DM). O mesmo efeito hipoglicemiante ocorreu no grupo não diabético, porém tratado com o chá (NDM5%) em comparação ao diabético tratado com o chá (DM5%). Os grupos não diabéticos tratados (NDM5%) ou não (NDM) exibiram glicemia menor do que o grupo DM. Por outro lado, não significância entre os grupos não diabéticos. Para a avaliação do efeito antioxidante da insulina vegetal, a atividade da enzima catalase foi avaliada nos plasmas dos animais, utilizou-se kit comercial (Cayman's Catalase Assay Kit), os valores médios da densidade óptica foram 2,59 ± 0,30; 2,84 ± 0,60; 1,82 ± 0,46; 3,20 ± 0,35; para os grupos NDM, DM, NDM5% e DM5%, respectivamente. Os animais diabéticos que receberam o chá apresentaram a atividade da catalase significativamente mais alta quando comparada aos grupos não diabéticos, tratados ou não. Este efeito da insulina vegetal na atividade sérica da catalase é inédito, pois até o presente momento, não foram encontrados artigos que referenciam estes resultados. A avaliação histológica, não houve influência da insulina vegetal nos padrões dos tecidos estudados (coração, rim e fígado). Este estudo avaliou a infusão de folhas de insulina vegetal e verificar seu efeito 5% de folhas de insulina vegetal e verificou seu efeito hipoglicêmico e antioxidante em animais diabéticos. No entanto, não causou lesões nos tecidos cardíacos, renais e hepáticos em

animais diabéticos ou não. São também necessários estudos pré-clínicos e clínicos para o uso correto e seguro desta planta.

Palavras chaves: *Cissus sicyoides* L., insulina vegetal, diabetes e catalase.

ABSTRACT

LEAL, AS; **Assessment of insulin infused leaf vegetable (*Cissus sicyooides* L.) in dehydrated rats *Wistar* induced Diabetes *Mellitus*** . Rio de Janeiro, 2013.

The use of medicinal plants are booming worldwide due to the high cost of manufactured drugs, the beneficial effects that are credited to them or to their own fad. These effects attract persons with degenerative diseases, like diabetes, that is a worldwide epidemic. Inumerous plants are studied in order to assist in the treatment of diabetes *Mellitus* type II, in Brazil we can highlight the insulin plant (Cissus sicyoides L.). This paper aims to assess the infused leaf of vegetable insulin 5% in *Wistar* rats healthy and with diabetes mellitus induced by streptozotocin®. The plant was collected in the municipality of Rio de Janeiro, sent to INJC / UFRJ to be cleaned, dried and milled and after to be stored in refrigerated. The experimental part had 20 rats, divided into two groups (DM E NDM), where diabetes was induced by the intraperitoneal route using streptozotocin ® and other group with distilled water, prior to induction were measured glucose levels and after three days were repeated the measurement to confirm that the animals were diabetic, and four groups were formed (DM DM5% NDM, NDM5%). After that, the treatment began with the infusion leaf of vegetable insulin 5%, which was administered for 28 days, during this period it was verified animal body weight, feed intake and blood glucose. Animals were euthanized by an overdose of Thiopental ®, in sequence the blood was collected for processing and analysis of catalase. The organs (heart, kidney and liver) were removed for histological analysis. The results obtained in relation to glucose levels at the end of the experimental period, show the action of vegetable insulin tea, clearly demonstrating the significant hypoglycemic effect of tea on diabetic animals (DM 5%) compared to the control group (DM). The hypoglycemic effect occurred even in non-diabetic group, but treated with tea (NDM5%) compared to the tea treated diabetic (DM5%). The nondiabetic group treated (NDM5%) or not (NDM), exhibited lower blood glucose than the DM group. On the other hand, no significant difference among the groups that was not diabetic. For evaluating the antioxidant effect of vegetable insulin, the activity of catalase was assessed in the animals plasmas, we used a commercial kit (Cayman's Catalase Assay Kit), the mean optical density were 2.59 ± 0.30; 2 84 ± 0.60, 1.82 ± 0.46, 3.20 ± 0.35, for groups NDM, DM, and% NDM5 DM5%, respectively. The diabetic animals that received the tea, showed catalase activity significantly higher when compared to non-diabetic groups, treated or not. This effect of vegetable insulin in serum activity of catalase is unprecedented, because not so far, there were no articles that reference these results. Histological evaluation, there was no effect of vegetable insulin in tissues studied (heart, kidney and liver). From the results of this study, was possible to avaliate the infused leaf of vegetable insulin 5% and check their hypoglycemic and antioxidant effect in diabetic animals. On the other hand, did not cause lesions in cardiac tissue, kidney and liver in diabetic

animals or not. Are also required preclinical studies and clinical trials for the correct and safe use of this plant.

Keyword: *Cissus sicyoides* L., insulin plant, diabetes e catalase.

1 INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos em terapias alternativas vêm crescendo na última década, tendo como base algumas pesquisas epidemiológicas que sugerem potenciais benefícios de alguns alimentos e substratos de plantas para a prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (SENGER, et al., 2011).

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma dessas, sendo uma doença metabólica crônica caracterizada por aumento da glicose no sangue. Está associada a uma deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Diabetes Mellitus tipo 2 é o mais comum e representa mais de 85% de todos os casos (OMS, 2011).

Os alimentos podem oferecer compostos benéficos ao organismo, tendo alguns estudos sugeridos que dietas ricas em antioxidantes, como os carotenos, estão associadas à diminuição de doenças não transmissíveis (LIMA et al., 2008).

O uso de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos, encontra-se em expansão em todo mundo em função do alto custo dos medicamentos industrializados, dos efeitos benéficos que lhes são creditados ou do próprio modismo (ROSA, et al., 2008).

Os fitoterápicos movimentam no mercado mundial cerca de US$ 21,7 bilhões/ano. No Brasil não existem dados oficiais, mas presume-se que anualmente gire no mercado brasileiro US$ 160 milhões com vendas desses produtos, que já cresceram mais de 15%, contra 4% dos medicamentos sintéticos (CARVALHO, et al., 2008).

O gênero *Cissus* é o maior da família *Vitaceae*, com cerca de 350 espécies distribuídas entre as Américas, Ásia e Austrália (LOMBARDI, 2000). Estudos realizados com algumas espécies de *Cissus* têm revelado várias atividades farmacológicas, dentre as quais se destacam as atividades antioxidante, antimicrobiana (MURTHY et al., 2003) e hipoglicemiante (BARBOSA et al., 2002) entre outras.

As atividades antioxidantes são mecanismos de defesa que previne ou reduz o efeito do estresse oxidativo através de enzimas endógenas (superóxido

dismutase, glutationa peroxidase e catalase) e outras substâncias da dieta (carotenoides, compostos fenólicos). O estresse oxidativo tem como componentes as espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são geradas durante processos celulares. No entanto, o excesso de ROS pode causar danos à célula gerando desequilíbrio ao organismo (CATANIA et al., 2009).

Nos constituintes químicos da insulina vegetal, foram encontradas as presenças de flavonóides, tanto em infuso quanto no extrato etanólico e de canferol livre aquoso (SILVA et al.,1996; BARBOSA et al., 2002).

As pessoas com doenças crônicas degenerativas, cada vez mais procura tratamentos alternativos, alguns destes tratamentos demandam os alimentos com potencial antioxidante e medicamentos ditos naturais, diante disto muitos estudos estão em andamento, mas ainda sem respostas conclusivas. Mas no momento em que os resultados destas pesquisas forem conclusivos com certeza a indústria alimentícia e a farmacêutica utilizarão com sucesso as substâncias bioativas. (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010).

O estímulo ao uso de fitoterápicos tem como objetivo prevenir, curar ou minimizar os sintomas de doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde (MIGUEL E MIGUEL, 1999).

A partir do conhecimento empírico e científico do *Cissus sicyoides* L., comumente conhecida como insulina vegetal, a hipótese do presente trabalho foi evidenciar, além da atividade hipoglicemiante, sua atividade antioxidante. Caso a hipótese seja confirmada, esta planta pode ser utilizada futuramente, após estudos clínicos, no controle glicêmico de pacientes com DM, auxiliando na defesa do organismo contra os radicais livres.

2 JUSTIFICATIVA

Muitas plantas têm sido cultivadas e utilizadas por séculos por seres humanos com propriedades importantes para prevenção e/ou cura de doenças (SABAA-SRUR et al., 2012). Dentre as plantas, destaca-se a *Cissus sicyoides* L., que é utilizada na medicina popular no controlo do DM, porém pouco estudada.

Nos últimos anos, nosso grupo tem estudado os perfis físico-químicos e o potencial antioxidante de *Cissus sicyoides* L. As folhas desidratadas e a polpa dos frutos da insulina vegetal apresentaram predominância no perfil lipídico de ácidos graxos insaturados (JUNQUEIRA, 2010). Este achado foi importante, uma vez que estudos têm demonstrado uma associação positiva entre ingestão de gordura saturada e aumento de eventos cardiovasculares, doenças arteroescleróticas, hipertensão arterial sistêmica e diabetes *Mellitus* (KANG e LEAF, 2000). A capacidade antioxidante do fruto da insulina vegetal foi superior as descritas na literatura dos frutos de açaí, jamelão e uva (JUNQUEIRA, 2010).

Posteriormente, avaliamos a composição mineral de folhas de insulina vegetal, a qual demonstrou ser uma boa fonte de cálcio, magnésio, potássio, manganês e selênio, que são essenciais para a manutenção da saúde (SABAA-SRUR et al., 2012).

Recentemente, investigamos o efeito da ingestão de infuso *Cissus sicyoides* L. na massa corporal, glicemia e no fêmur de ratos *Wistar* machos. Verifcamos que a ingestão diminui significativamente a glicemia, e a massa corporal na última semana do experimento, mas diminuiu a massa e a densidade mineral óssea do fêmur (DA SILVA et al., 2013), sugerindo que o consumo pode aumentar o risco de fragilidade óssea.

A partir dos estudos anteriores do nosso grupo e daqueles descritos por Beltrame et al. (2001 e 2002), Barbosa et al (2002), Viana et al (2004) e Santos et al (2008) relacionados aos efeitos hipoglicemiantes, fez-se necessário um estudo sobre o efeito do infuso de insulina vegetal nos parâmetros antioxidantes e histológicos, além do efeito hipoglicemiante.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil com sua grande extensão territorial e condições climáticas favoráveis que permite o cultivo de diversas espécies de plantas, vegetais e frutos, que podem ser utilizadas como matéria prima para o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos (ARAÚJO et al, 2004). Há poucos estudos, como o bajuru (*Chrysobanalus icaco*, L.), o buriti (*Mauritia vinífera ou flexuosa*, Mart) e a insulina vegetal (*Cissus sicyoides*, L.), o que colabora para escassez de informações cientíticas, mas a população os utiliza sem saber seus reais benefícios (LORENZI et al., 2004).

3.1 *Cissus sicyoides* L.

3.1.1 Classificação e Aspectos Botânicos

Cissus sicyoides L. (Figura 1) pertence ao Reino Plantae, Subreino Traqueobionta, sendo uma Spermatophyta e Magnoliophyta. É da classe Magnoliopsida, sendo uma dicotiledôneas, da subclasse Rosidae, Ordem Rhamanles e da família Vitaceae, conforme os estudos de Lombardi (2000).

Figura 1: Planta *Cissus sicyoides* L.Tropical plant catalogo (www.toptropicals.com; acesso: 08/02/2013)

A família Vitaceae apresenta 12 gêneros e aproximadamente 800 espécies, que estão localizadas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (ALBUQUERQUE, 1989; SOUZA e LORENZI, 2005). O gênero *Cissus* é o maior da família Vitaceae, com cerca de 350 espécies distribuídas entre as Américas, Ásia e Austrália (ALBUQUERQUE,1989; MURTHY et al., 2003; SILVA et al., 2007).

No Brasil, conforme estudos de Lombardi (2000), essa família é representada somente pelo gênero *Cissus*, com 42 espécies, sendo arbustos sarmentosos, nodosos, com râmulos articulados, folhas inteiras ou lobadas com duas estípulas peciolares (BERG, 1993). Estudos realizados com algumas espécies de *Cissus* demonstram atividade farmacológica, principalmente antioxidante, antimicrobiana e hipoglicemiante (MURTHY et al., 2003; SILVA et al., 2007; BARBOSA et al., 2002).

A espécie desenvolve-se em matas primárias, secundárias, cerrados, caatingas, campos, vegetações de altitude e litorânea, de 0 a 1800 m, apresentando flores e frutos ao longo de todo o ano (LOMBARDI, 1994 e 2000).

A espécie *Cissus sicyoides* L. apresenta várias sinonímias, tais como *Cissus verticillata* L., *Cissus latifólia* D., *Cissus tinctoria* M., entre outras (LOMBARDI, 2000). Pode ser encontrada na Região Amazônica onde é conhecida popularmente como “insulina”, “anil trepador”, “cipó-pucá”, “cortina japonesa” e “uva branca”. As suas folhas são empregadas externamente no tratamento do reumatismo e de abscessos. Já as infusões das folhas e do caule são muito utilizadas na inflamação muscular, epilepsias, derrame cerebral, hipertensão arterial diabetes *mellitus*, que em função dos efeitos benéficos relatados, popularmente passou a ser chamada de insulina vegetal (ALBUQUERQUE, 1989; BELTRAME et al., 2001; PEPATO et al.,2003).

A espécie *Cissus sicyoides* L. é uma herbácea trepadeira, perene, vigorosa, com ramos e folhas poucos carnosos, possuindo gravinhas opostas às folhas. As folhas são simples, membranáceas, glabras, de quatro a sete

centímetros de comprimento, as flores são pequenas, de cor creme, dispostas em fluorescências corimbiformes e o fruto drupa ovoide-globoso, de cor roxo-escuro, com polpa carnosa, contendo uma única semente de aproximadamente seis milímetros de comprimento, multiplicando-se tanto pelo enraizamento dos ramos ou com o plantio das sementes (BELTRAME et al, 2001; VIANA et al, 2004).

3.1.2 Constituinte químico

A literatura disponibiliza poucos artigos que comentam sobre os constituintes químicos da planta insulina vegetal, mas os artigos que os descrevem, encontraram cetoesteróides, carotenoides, vitamina E e alcaloides. Em 2002, Barbosa e colaboradores demonstraram na fração acetato de etila do extrato aquoso das folhas, flavonóides como canferol, luteolina e luteolina-3-sulfato. Já Dominici e colaboradores (2003) analisaram o extrato hidroalcóolico da planta inteira e constataram metabólitos secundários taninos, terpenos esteroides/triterpenóides e alcalóides. Nas folhas foram isoladas e identificadas cumarinas 5,6,7,8 – tretrahidroxicumarina-5-xylopyranosideo e sabadina, os flavonóides Kaempherol 3 – ramínosideo e quercetina 3 – ramínosideo e os triterpenos esteroidais – sitoterol, sitosterol – D – glicopiranosídeo e antocianinas (BELTRAME et al., 2002; GARCIA et al.,1999). Nas partes aéreas com extrato metanólico foram observados os compostos b-sitosterol e sitosterol –b- D – glicopiranosídeo (BELTRAME et al., 2002). O resveratrol foi encontrado no extrato acetato de etila das folhas e o biciclogermacreno no extrato clorofórmico das folhas (SILVA et al., 2007). Já Silva et al (1996) identificaram carotenos nas folhas desse vegetal, sendo o α-caroteno e β- caroteno os majoritários.

Apesar de ser muito utilizada pela população de forma empírica, onde acreditam que esta planta previne e/ou melhora sintomas de diversas doenças, há pouquíssimos estudos que comprovam os benefícios reais da insulina vegetal (*Cissus sicyoides* L.). Na medicina popular, ou simplesmente as crenças que antepassados indígenas deixaram, que as plantas curam e, a população utiliza-se de diversas plantas, sendo a insulina vegetal utilizada para o preparo de chá, a partir das folhas, no tratamento do Diabetes *mellitus*

(BARBOSA et al., 2002), como anti-inflamatório, antiepilético, anti-hipertensivo, antitérmico, antirreumático (BELTRAME et al, 2001), antigripal, contra infecções respiratórias (GARCIA et al, 1999, AGRA, FREITAS e BARBOSA-FILHO, 2007), dislipidemia, problemas urinários (LANS, 2006) e indigestão (FERREIRA et al, 2008).

3.1.3 Atividade hipoglicemiante da insulina vegetal

Estudos estão sendo realizados com a finalidade de comprovar cientificamente a ação da insulina vegetal no controle glicêmico e no metabolismo lipídico (BELTRAME et al, 2002; BELTRAME, PEPATO et al, 2003; SANTOS et al, 2008;

Viana *et al* (2004) investigaram os efeitos hipoglicêmico e antilipidêmico do extrato aquoso de folhas do *Cissus sicyoides* L. administrado por via oral por 7 dias em ratos diabéticos induzidos por Alloxan Sódica. Os autores observaram uma diminuição significante na glicemia dos ratos diabéticos. Entretanto, a insulina vegetal não teve efeito na glicemia dos ratos normais.

Santos *et al* (2008) realizaram estudos clínicos de fase II com pacientes de ambos os sexos, intolerantes a glicose e pacientes diabéticos tipo II (39-59 anos). Estes autores demonstraram um efeito hipoglicemiante significativo após 120 minutos, da ingestão do chá de folhas de insulina vegetal, porém não houve aumento da resistência à insulina. Foi utilizado o chá da folha de insulina para avaliar o teste de variação espontânea da glicemia, onde a mesma não apresentou efeito hipogicemiante significativo.

Apesar de alguns estudos demonstrarem o efeito hipoglicemiante desse fruto, Beltrame e colaboradores (2001) verificaram que o extrato de folhas de insulina vegetal aumentou o grau de intolerância à glicose promovida pelo decadron que foi inoculado nos ratos, sugerindo um efeito diabetogênico e não antidiabético como acredita a população usuária dessa planta. O tratamento com o extrato hidroalcoólico promoveu discreta redução da glicemia em relação ao grupo controle, associado ao fato de que alguns flavonóides apresentam propriedades antidiabéticas. Esses resultados estão de acordo com a literatura científica, que aponta inúmeros compostos com potencial antidiabético, porém não confirmados em estudos laboratoriais.

Outro estudo de Beltrame e colaboradores (2002) demonstraram que o *Cissus sicyoides* L. não afetou os níveis de glicose no sangue desses animais. Entretanto, o grupo de ratos que recebeu insulina vegetal teve aumento dos níveis de colesterol e de triglicerídeo (efeito reversível). Isso ocorreu por causa da alta quantidade de constituintes de lipídeos no gênero *Cissus* isolados da parte aérea dessa planta.

Ao contrário do estudo realizado por Beltrame e colaboradores (2003) observaram redução da glicemia, glicosúria e uréia em ratos diabéticos em comparação com os animais controle, e o metabolismo lipídico não foi alterado pelo tratamento, mostrando que o mecanismo responsável pela melhora no metabolismo dos carboidratos não envolveu inibição de glicogenólise e/ou estimulação da glicogênese.

3.2 Atividade antioxidante de plantas

Antioxidante é definido como uma substância que retarda ou previne a oxidação de um substrato. O mecanismo de combate aos radicais livres pode ser primário e secundário, ou ainda classificado como sintético ou natural. A ação dos antioxidantes atinge diferentes níveis do processo de oxidação, podendo agir na diminuição de oxigênio, inibindo a iniciação da oxidação, quelando íons metálicos e destruindo produtos primários (SUCUPIRA et al, 2012). Os antioxidantes podem ser não enzimáticos (minerais e vitaminas) e enzimáticos (BIANCHI E ANTUNES,1999).As enzimas antioxidantes podem ser a glutationa peroxidase, a superóxido dismutase e catalase. A catalase é um fator antioxidante envolvida na diminuição dos radicais livres (TURKSEVEN et al., 2005).

Os flavonóides (pigmentos) são antioxidantes que protegem o organismo de danos produzidos por agentes oxidantes, sendo estes compostos encontrados nas folhas, bem como taninos, triterpenos, esteróides, aminoácidos e compostos graxos (LIZAMA et al., 2000). O pigmento natural encontrado no fruto, contendo antiocianina, refere um potencial benéfico à saúde em virtude da ação antioxidante, bem como uma possível utilização deste como corante natural, pela indústria alimentícia (ESPÍN et al., 2000).

A atividade antioxidante foi relatada por Murthy (2003) quando estudou algumas espécies de *Cissus*. Braga (2008) isolou o flavonóide rutina na fração de acetato de etila das folhas de insulina vegetal, possuindo várias atividades farmacológicas descritas, sendo uma delas a atividade hipoglicemiante, antibactericida, anti-inflamatória e vasodilatadora (KAMALAKKANNAN & PRINCE, 2006).

3.3 Fitoterápicos

A população faz o uso empírico de plantas há milênios, aguçando o interesse de muitos pesquisadores, com o objetivo de conhecer novos substratos e atividades que podem ser usadas em terapias, sendo estas chamadas de plantas medicinais (LIMA, et al, 2013).

As plantas medicinais são culturas populares no mundo inteiro, no Brasil já há várias prefeituras que estão adotando o uso de fitoterápicos em seus serviços públicos de saúde, como é o caso de Vitória (ES), Curitiba (PR), Rio de Janeiro (RJ), Itapioca (CE) e Ribeirão Preto (SP). A importância da avaliação destas experiências pode auxiliar nas questões de redução de custo de medicamentos convencionais. (ROSA et al., 2008).

Os fitoterápicos são responsáveis pela melhora na vida estressante da população, que faz uso de alimentos e produtos naturais tendo uma sensação de qualidade de vida (SCHMITZ et al., 2011).

A legislação em vigor no Brasil define como fitoterápico “aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3”. (BRASIL, 2004).

O relatório final da 10ª Conferência Nacional de Saúde, em 1998, determinou que os gestores do Sistema Único de Saúde (SUS) devem estimular e aumentar as pesquisas realizadas com parceria de universidades públicas, promovendo terapias complementares a fitoterapia (SANTOS, et al., 2011).

Informações sobre registro podem ser obtidas diretamente pelo site da ANVISA, buscando o fitoterápico pelo nome comercial, princípio ativo, nome da empresa detentora do registro ou número do registro, assim a população fica atenta aos produtos ainda não registrados e que podem provocar danos à saúde (CARVALHO et al., 2008).

A possibilidade de desenvolvimento de uma indústria de fitoterápicos é de execução trabalhosa em função dos custos deste processo ser de difícil mensuração já que para isso é necessário um modelo que apresente cadeia agrícola estruturada, preparo dos insumos, boas práticas de fabricação, técnicas de inovação e claro uma preocupação com o meio ambiente e sustentabilidade (ZUANAZZIC E MAYORGA, 2010).

3.4 Diabetes *mellitus*

A OMS relata a prevalência do DM aumenta globalmente, principalmente nos países em desenvolvimento, devido o agravamento do sobrepeso, da obesidade e do sedentarismo (OMS, 2011).

O número estimado de pessoas com diabetes na América Latina deve aumentar em mais de 50%, de 13,3 milhões em 2000 para 32,9 milhões em 2030 (IDF, 2009), conforme Figura 2. Wild (2004) estima que 90% do número de indivíduos diabéticos em 2030, tenham diabetes tipo 2.

O crescimento da prevalência do DM repercurte no aumento dos custos anuais. Estudo realizado nos Estados Unidos e na América Latina demonstrou custos diretos e indiretos de cerca de US$ 102,5 e US$ 94,3 bilhões, respectivamente. A elevação no custo com os tratamentos afeta o sistema de saúde e a sociedade (MARINHO *et al*, 2010).

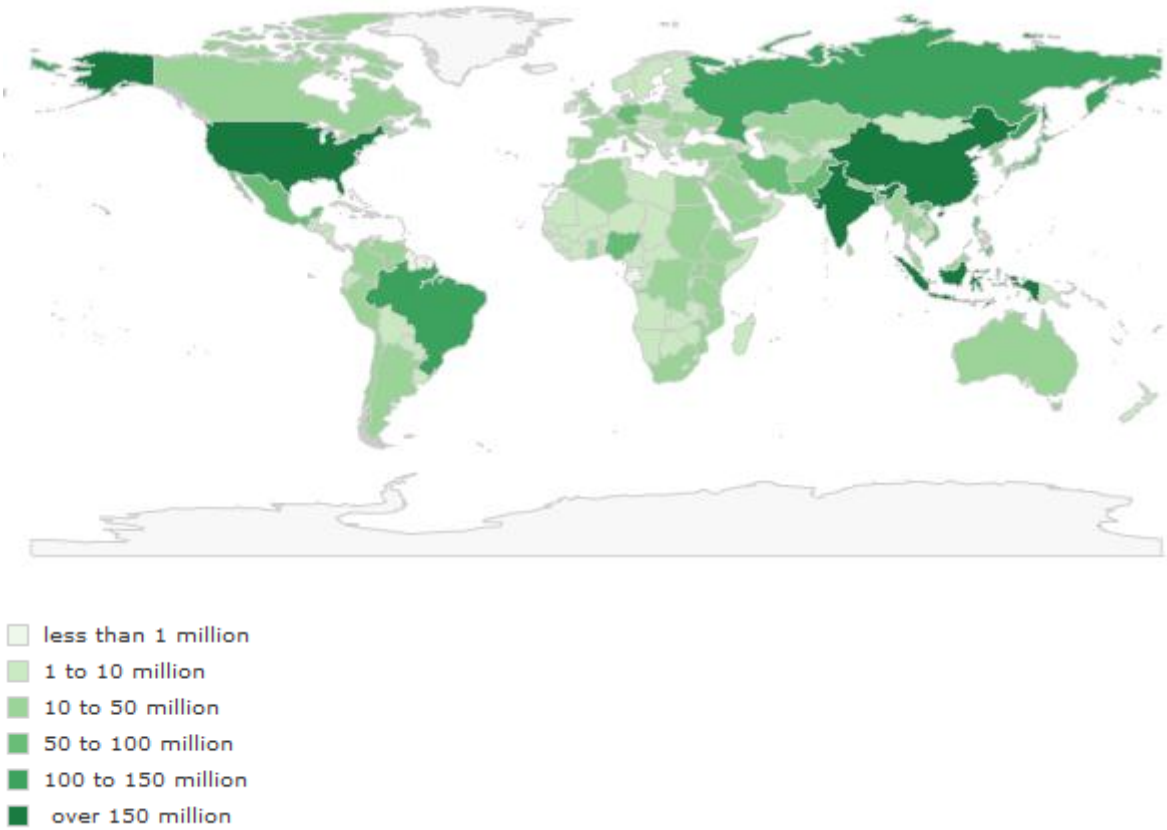


Figura 2: Incidência de DM no mundo. IDF (International Diabetes Federation, 2011)

O DM é definido como uma desordem metabólica de diversas etiologias, caracterizada por hiperglicemia crônica, decorrente de anormalidades na secreção e / ou ação de insulina, afetando o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A hiperglicemia crônica é associada à falência a longo prazo de vários órgãos. Os sintomas mais comuns incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes com polifagia e visão turva, tendo a hiperglicemia crônica. As consequências agudas do diabetes, não controlado são a hiperglicemia com cetoacidose ou síndrome hiperosmolar não cetótica (ADA, 2012).

Os tipos de DM mais comuns são o Diabetes *melittus* tipo 1 e o tipo 2 (DMT1 e DMT2), que são doenças graves, com alterações no funcionamento das células beta pancreáticas (OMS, 2013).

As complicações do diabetes são inúmeras, na maioria das pesquisas experimentais e clínicas, demonstram que estas são alterações metabólicas, decorrente da hiperglicemia. As doenças cardiovasculares representam 52%

das mortes dos diabéticos tipo 2 (GROSS; NEHME,1999). A hiperglicemia é o fator primário, seguido de inúmeras complicações que comprometem as macroangiopatias, como as artérias coronarianas, membros inferiores e cerebrais, e as microangiopatias, sendo a retina, o glomérulo renal e os nervos periféricos (FERREIRA, et al., 2011).

O tratamento da DM requer modificações de uma série de fatores na vida dos pacientes. Na maioria dos casos os doentes querem melhorar seus sintomas, não interessando como, se será com medicamentos prescritos pelo médico que o acompanha há anos ou tomando um chá ou semente que são indicadas por parentes e vizinhos, mesmo que pareça pouco provável, se apegam de tal maneira recarregando suas esperanças (SILVA et al, 2006).

O estudo de Castro e colaboradores (2010), que avaliou a proporção do uso da medicina tradicional e de outros recursos terapêuticos, demonstraram que 70,9% dos pacientes faz uso da medicina complementar ou alternativa, sendo e a prática mais utilizada, em 56,4% o uso de chá, seguido por 53,8% de dietas não a prescrita por nutricionistas e 51,3% por orações.

3.4.1 Estresse oxidativo e Diabetes *melittus*

A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, durante os processos metabólicos, atuando como mediadores na transferência de elétrons, em inúmeras reações bioquímicas (BARBOSA et al, 2010). Eles são moléculas ou íons que possuem um eletro desemparelhado, na última camada conferindo alta reatividade (FERREIRA e MATSUBARA,1997).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena, tendo este processo associado ao envelhecimento e outras tantas doenças crônicas degenerativas (SALES, 2011).

O excesso apresenta efeitos perigosos, como a peroxidação dos lipídios e agressão às proteínas dos tecidos e membranas, às enzimas, carboidrato e DNA, estando assim relacionados com diversas patologias. Este excesso é combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo, sendo os enzimáticos: glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e os não enzimáticos: glutationa (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas

ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Também o organismo produz antioxidantes oriundos da dieta como *a*-tocoferol (vitamina-E), β-caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides (BARREIROS E DAVID, 2006).

A DM insulino dependente é caracterizada por uma série de complicações que afetam o organismo e os radicais livres podem estar envolvidos , principalmente durante a hiperglicemia, onde ocorre um aumento destes radicais livres, através da auto-oxidação da glicose, e esses exercem seus efeitos resultando na formação
de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (MAZZANTI et al., 2003).

Poucos estudos avaliam o estresse oxidativo em DM tipo I, Reis e colaboradores (2008), avaliaram alguns estudos de metodologias diferenciadas, poderam observar que na maioria deles houve um aumento do estresse oxidativo em estágios precoce da doença, que se manteve ao longo de seu desenvolvimento.

O estudo realizado por Mazzanti e colaboradores (2003) referiu um aumento da atividade da catalase nos tecidos renais e hepáticos dos animais que foram tratados com o extrato da casca de *Syzygium cumini* (conhecido como jamelão), demonstrando uma atividade removedora de radicais livres.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar o infuso a 5% de folha de insulina vegetal (*Cissus Sicyooides* L.) desidratadas em ratos *Wistar* sadios e com Diabetes *Mellitus* induzida com streptozotocina.

4.2 Objetivos Específicos

- Caracterização físico-químicamente das folhas de insulina vegetal;
- Monitorar a glicemia dos animais sadios e diabéticos tratados;
- Avaliar a massa corporal e eficiência alimentar dos animais;
- Avaliar os possíveis efeitos histológicos no coração, no rim e no fígado dos animais;
- Verificar o efeito antioxidante do infuso;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Folhas

As folhas de insulina vegetal foram colhidas na região da zona oeste do município e no estado do Rio de Janeiro, entre agosto de 2011 a novembro de 2012. Logo após as colheitas, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno e transportado em caixa térmica tipo isopor® contendo gelo, para o Laboratório de Análise e Processamento de Alimentos (LAPAL) do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC) e armazenados sob refrigeração até o momento de sua utilização (IAL, 2005).

As análises físico-químicas foram realizadas conforme método do Instituto Adolf Lutz (2005).

5.2 Manuseio da matéria – prima

No LAPAL as folhas de insulina vegetal foram selecionadas, sendo eliminadas aquelas que apresentaram algum defeito, atacados por insetos ou danos físicos.

5.2.1 Higienização das folhas de insulina vegetal

As folhas de insulina vegetal foram lavadas em água corrente à temperatura ambiente, individualmente, sendo removidas as sujidades. Após remoção máxima do residual de água com auxilio de papel toalha, foram distribuídas uniformemente em bandejas e conduzidas para o secador.

5.2.2 Desidratação das folhas

As bandejas de aço inoxidável com as folhas foram colocadas no secador, onde o ar aquecido a 55 ± 5ºC era insuflado paralelamente sobre o produto até que o teor de umidade atingisse um residual entre 5-10%. Alíquotas antes da desidratação foram utilizadas para determinação do teor de umidade inicial (IAL, 2005).

5.2.3 Triturações, embalagem e armazenagem

Os produtos desidratados foram triturados com ajuda de um moinho e alíquotas em torno de 90g foram acondicionadas em sacos de polietileno com alta proteção ao vapor d'água e ao oxigênio atmosférico. Já embalados a vácuo foram armazenados sob congelamento (-18ºC), sendo devidamente identificados com o nome do experimento, data e nome do pesquisador.

5.3 Experimentação animal

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde /UFRJ, sob o número INJC012 (anexo 1) conforme as recomendações dos procedimentos com experimentação animal (PRESGRAVE et al., 2008).

Os animais foram disponibilizados pelo Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro (LABNE/ UFF), onde foram mantidos em condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C), umidade (60 ± 10%) e ciclo claro-escuro (12 : 12 h). *Wistar* machos (n=20) com 12 semanas de idade foram divididos em dois grupos de acordo com o tipo de injeção que receberam: diabético (DM, 50mg/kg de Streptozotocina®) e

não diabético (NDM, água destilada). Os animais receberam dieta padrão (NUVILAB-CR1) *ad libitum* por 28 dias de acordo com as preconizações da AIN-93M (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993). A descrição da dieta é demonstrada na tabela 1.

Tabela 1: Dieta experimental padrão oferecida aos animais

Elementos	**Quantidade**
Valor energético	350, 5 Kcal
Carboidrato	74 %
Proteína	22 %
Lipídio	4 %
Fibra	8,0 g
Ferro	50,00 mg
Zinco	60,00 mg
Cobre	10,00 mg
Iodo	2,00 mg
Manganês	60,00 mg
Selênio	0,05 mg
Cobalto	1,50 mg
DL-metionina	300,00 mg
Lisina	100,00 mg
Antioxidante	100,00 mg

*Valores por 100g da dieta
Fonte: NUVILAB-CR1

5.3.1 Indução do diabetes

Os animais ficaram em jejum de seis horas para a indução do diabetes. Antes do procedimento os animais foram pesados e dosada a glicemia de jejum através de uma pequena incisão na cauda dos animais, em glicosímetro Accu-chek active® (Roche®, Alemanha).

Todos os animais foram submetidos ao mesmo nível de estresse do procedimento, os grupos que não sofreram a indução foram injetados com a mesma quantidade de água destilada na dose de 13,8ml/kg de peso.

A indução do diabetes foi feita com o uso da Streptozotocina® (Sigma Chemical, EUA), na dose de 50mg/Kg de peso do animal, pela via peritoneal, conforme descrito por Lima e colaboradores, 2011.

Após três dias da indução, os animais, novamente foram deixados seis horas em jejum e submetidos ao procedimento supracitado para determinação da glicemia. Após a confirmação da elevação acima de 130 mg/dL os animais foram novamente divididos em quatro grupos: diabético (DM, 50mg/kg de

Streptozotocina®), diabético 5% (DM 5%, 50mg/kg de Streptozotocina® + infuso de insulina vegetal), não diabético (NDM, água filtrada) e não diabético 5% (NDM 5%, água filtrada + infuso de insulina vegetal).

Para controle e acompanhamento do *status* glicêmico, as glicemias foram dosadas de 10 em 10 dias, conforme procedimento supracitado.

5.3.2 Preparo e oferta do infuso de insulina vegetal

Os infusos foram preparados horas antes para que os mesmos esfriassem antes de serem ofertados. Para o preparo ferveu-se a água, até entrar em ebulição, pesou-se o pó da folha desidratado, em uma concentração de 5%. Após, em um becker, despejou-se o pó da folha desidratada, a água fervente e tampou, deixando em temperatura ambiente por 15 minutos.

O infuso foi distribuído em frascos de vidro de 500 mL previamente higienizadas e ofertadas uma alíquota de aproximadamente 200 mL, para os grupos tratados, os grupos controles foram ofertadas água filtrada

5.3.3 Controle de ingestão

O infuso foi ofertado três vezes por semana *ad libitum*, sendo preparado somente no dia. O consumo do infuso era medido através da diferença entre o ofertado e o consumido. Além disso, semanalmente, o consumo de ração era mensurado utilizando o mesmo procedimento.

5.3.4 Controle da glicemia

O controle da glicemia foi realizado em cinco momentos: no dia da indução, no dia da verificação do diabetes, após 10 e 20 dias, e na eutanásia (anexo 2).

5.3.5 Eutanásia

Na véspera da eutanásia, os animais ficaram em jejum por seis horas e no dia administrou-se via intraperitoneal uma sobredose de Thiopentax® na dose de 0,15ml/kg de peso diluído em água destilada na concentração de 16ml/g (CARDOZO, et al, 2010; SALLES, 2011).

Uma incisão mediana na região torácica foi realizada e o coração exposto. O sangue foi coletado através de punção cardíaca no átrio direito, sendo

cuidadosamente aspirado objetivando a não ocorrência de hemólise e armazenado em dois tubos de ensaio para posterior centrifugação.

Posteriormente foi realizada uma incisão no abdome e coletados o coração, rins e fígado, que foram pesados (balança) e colocados na formalina 10% para posterior análise histológica.

As carcaças dos animais foram depositadas em sacos específicos e congeladas, para posteriormente serem descartadas.

5.3.6 Processamento do sangue

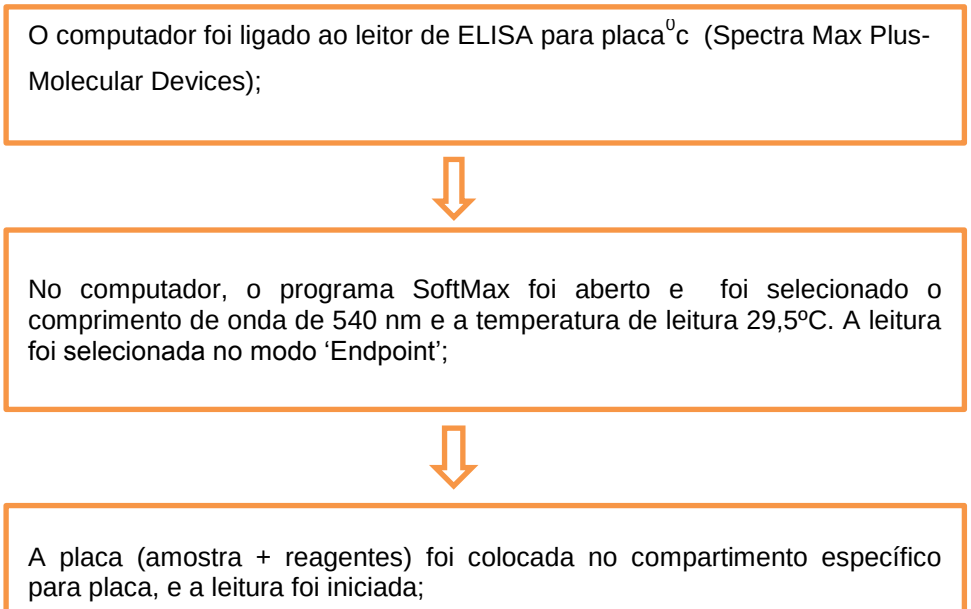
O sangue heparinizado foi centrifugado para obtenção do plasma. O plasma foi obtido através da centrifugação (120 g/15 minutos) em temperatura ambiente. As amostras foram imediatamente armazenadas a temperatura de -20º C.

5.3.7 Análise da Catalase sérica

O plasma foi transportado em caixa térmica com gelo seco ao Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (LITEB/ FIOCRUZ), para realização da análise da catalase.

Para a realização da análise da catalase utilizou-se kit comercial (Cayman's Catalase Assay Kit, 2009), para determinação da atividade da enzima, tendo os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O.).

Fluxograma 1: Análise do Kit de Catalase



5.3.8 Análise histológica

Após a eutanásia, os órgãos (coração, rim e fígado) foram coletados cuidadosamente e colocados em tubos de polipropileno (Falcon®) com formalina 10%. Em seguida foram transportados, de acordo com as práticas de biossegurança (TEXEIRA & VALLE, 2010) ao Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (LITEB/ FIOCRUZ), para o processamento dos tecidos. Todos os processo abaixo seguiram a metodologia de De Souza (2000).

5.3.8.1 Processamento dos tecidos e inclusão em parafina

Os órgãos foram retirados do fixador e então clivados. Posteriormente sofreram processos de desidratação, com banhos sucessivos de álcool e diafanização (clarificação) através de banhos de xilol absoluto.

Os cortes foram incluídos em parafina (em dois banhos sucessivos de 1h) com ponto de fusão entre 56 e 58ºC, desejada para os trabalhos de rotina. Os tecidos previamente infiltrados, foram colocados no fundo da fôrma preenchida com parafina derretida. Em seguida foram resfriados e obtidos blocos.

5.3.8.2 Microtomia e montagem dos cortes na lâmina

Para a microtomia, o micrótomo foi regulado em 5 µm. Os blocos foram resfriados com gelo antes de serem cortados. Após a microtomia, os cortes (tecido cortado e parafina) ligeiramente enrugados foram colocados em cuba de banho-Maria para serem estirados e colocados em lâmina de vidro.

5.3.8.3 Desparafinização, re-hidratação, coloração e montagem

Antes de corar as lâminas com os cortes, removeu-se a parafina residual através do xilol absoluto (banhos sucessivos de três minutos). Em seguida as lâminas passaram por banhos sucessivos de três minutos em álcool absoluto (três soluções) e água destilada. E na sequência, foi feita a coloração por Hematoxilina e Eosina.

Após a coloração, os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com o auxílio do Bálsamo do Canadá.

5.3.8.4 Interpretação das lâminas

Como a análise histopatológica exige prática, conhecimento e formação, todas as lâminas foram avaliadas pela Dra Andréa Rodrigues Cordovil Pires (médica patologista) do laboratório Fonte Medicina Diagnóstica. Realizou-se a análise qualitativa das características morfológicas encontradas nas lâminas.

5.4 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos em média e erro padrão. Os dados foram avaliados primeiramente para testar a normalidade e homogeneidade das variâncias. Para a análise da glicemia pré e pós a indução de Streptozotocina foi feito o teste t-pareado, para os demais parâmetros foi feito o teste de análise de variância (ANOVA) com um fator e pós-teste de Tukey. Para todas as análises utilizou-se o software GraphPad Prism® versão 5,03 (La Jolla, CA, USA). Um valor de $P<0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

6 RESULTADOS

6. 1 Determinações químicas e físicas das folhas de insulina vegetal

As determinações químicas e físicas realizadas de acordo com as normas do IAL (2005) foram as seguintes: Umidade, cinza, proteína e lipídio. O carboidrato foi encontrado a partir de estimativa por cálculo. Os resultados das médias das análises das folhas de insulina vegetal estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Média dos resultados das análises químicas das folhas de insulina vegetal

Análises	Média ± Desvio Padrão
Umidade (g %)*	12,19 ± 0,49
Cinza (g %)*	3,07 ± 0,06

Proteína (g %)*	16,59 ± 0,37
Lipídio (g %)*	6,21 ± 0,54

*Todas as análises tiveram 6 amostras (repetições)

6.2 Ingestão alimentar e eficiência alimentar

A ingestão alimentar e a eficiência alimentar não se mostraram diferentes entre os grupos (p> 0,05). (Tabela 3).

Tabela 3: Parâmetros dietéticos dos grupos estudados

Parâmetros	Grupos			
	DM	**DM 5%**	**NDM**	**NDM 5%**
Ingestão alimentar (g)	16,73±1,43	16,56±0,62	18,23±0,94	17,81±1,08
Eficiência alimentar (g/Kcal)	8,35±0,26	7,98±0,18	7,79±0,59	7,81±0,10

DM, Diabético; DM5%, Diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides L*.; NDM, Não Diabético; NDM5%, Não Diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides L*.; Os dados são apresentados em média ± erro padrão.

6.3 Massa corporal

Todos os grupos de animais iniciaram o experimento com a média da massa corporal similar (p>0,05). Uma vez por semana, os animais foram pesados para a avaliação do ganho de peso (Tabela 4). Não houve diferença significativa na massa corporal e no ganho de peso entre os grupos.

Tabela 4: Massa corporal dos grupos estudados

Parâmetros	Grupos			
	DM	**DM 5%**	**NDM**	**NDM 5%**
Peso inicial (g)	78,80±6,85	78,20±4,04	73,60±0,812	80,60±8,23
Peso final (g)	249,10±18,45	239,90±7,06	245,60±9,60	250,60±16,27
Ganho de massa (g)	170,3±12,04	161,7±5,982	171,00±9,80	166,00±10,40

DM, Diabético; DM5%, Diabético 5% de folha de *Cissus Sicyoides L*.; NDM, Não Diabético; NDM5%, Não Diabético 5% de folha de *Cissus Sicyoides L*.; Os dados são apresentados em média±erro padrão

.

6.4 Massa dos órgãos

Ao final do experimento, foi realizada a pesagem dos órgãos (coração, rim e fígado). Não havendo diferença significância entre os grupos. (Tabela 5).

Tabela 5: Massa dos órgãos dos animais dos 4 grupos estudados (média e erro padrão)

Parâmetros	**Grupos**			
	DM	**DM 5%**	**NDM**	**NDM 5%**
Coração mg)	916,60±71,84	873,60±29,07	938,40±33,20	814,20±49,38
Rins (mg)	1036,00±45,73	1111,00±27,14	1128,00±44,79	1053,00±48,91
Fígado (mg)	1760,00±167,20	1519,00±104,50	1781,00±65,38	1757,00±37,33

DM, Diabético; DM5%, Diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides* L.; NDM, Não Diabético; NDM5%, Não Diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides* L.

6.5 Glicemia

6.5.1 Glicemia Pré Indução

A glicemia foi verificada em todos os animais antes da indução, encontrado similaridade (Figura 3). Os níveis glicêmicos (média e erro padrão) dos grupos DM e NDM foram 133,90 mg/dL ±3,99 e 53,80 mg/dL ±0,10, respectivamente.

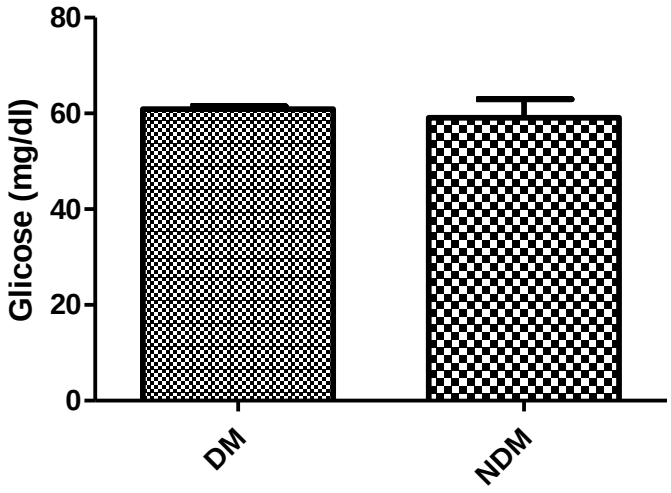


Figura 3: Níveis de glicemia expressos em média e erro padrão antes da indução por Streptozotocina. DM (Diabético); NDM (Não Diabético).

6.5.2 Pós Indução de Streptozotocina

Após três dias da indução com Streptozotocina, verificou-se a glicemia dos animais para a confirmação do diabetes *melittus*. Conforme o esperado, os animais do grupo DM apresentaram um valor de glicemia significativamente maior que os animais do grupo NDM (p=0,0003) (Figura 4).

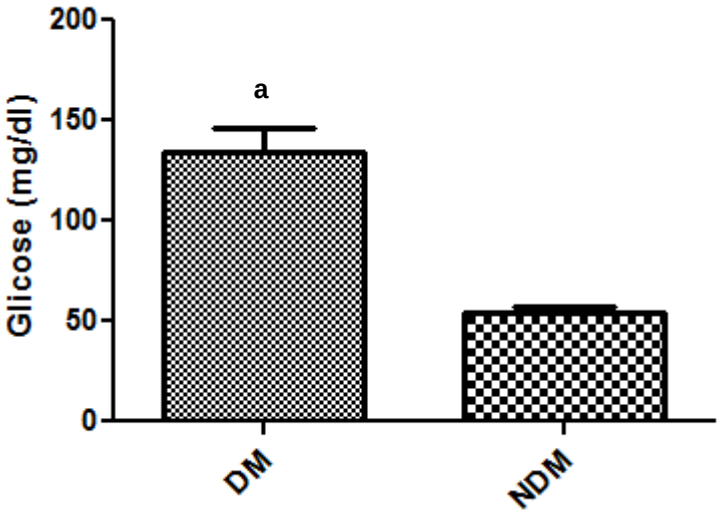


Figura 4**:** Níveis de glicemia após a indução por Streptozotocina, expressos em média e erro padrão. DM (Diabético); NDM (Não Diabético). [a] DM>NDM (p<0,0003)

6.5.3 Glicemia Final

Ao final do experimento, a glicemia foi mensurada para verificar a ação do chá de insulina vegetal. A figura 5 permite a visualização do efeito hipoglicemiante significativo do chá em animais diabéticos (DM 5%: 85,00 ± 0,45) em comparação ao grupo DM (119,80 mg/dL ± 7,19). O mesmo efeito hipoglicemiante ocorreu no grupo NDM5% (55,00 mg/dL ± 1,41) em comparação ao DM 5% (119,80 mg/dL ± 7,19). Os grupos NDM5% (55,00 mg/dL ±1,41) e NDM (65,00 mg/dL ±8,53) exibiram glicemia menor do que o grupo DM (119,80 ± 7,19). Por outro lado, não houve significância entre os grupos não diabéticos.

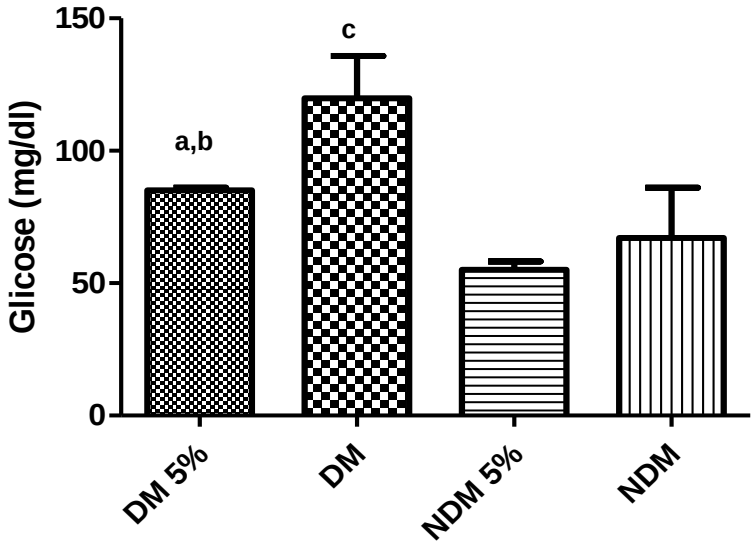


Figura 5**:** Níveis de glicemia expressos em média e erro padrão ao final do experimento. DM 5% (diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides* L.); DM (Diabético); NDM5% (Não Diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides* L.); NDM (Não Diabético). [a]DM5%<DM ($p<0,05$); [b]DM5%>NDM5%, [c]DM>NDM5% e DM>NDM. Notar o efeito antiglicêmico da insulina vegetal.

6.5.4 Catalase

Os valores médios da densidade óptica da catalase foram 2,59 ± 0,30; 2,84 ± 0,60; 1,82 ± 0,46; 3,20 ± 0,35; para os grupos NDM, DM, NDM5% e DM5%, respectivamente (Figura 6). Os animais diabéticos que receberam o chá apresentaram a atividade da catalase significativamente mais alta quando comparada aos grupos não diabéticos, tratados ou não.

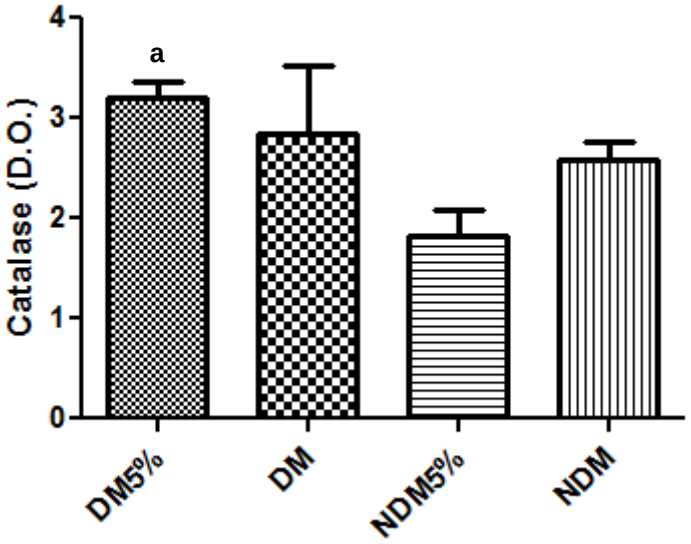


Figura 6: Atividade da catalase expressa em densidade óptica (D.O.) dos grupos DM 5% (diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides* L.); DM (Diabético); NDM5% (Não Diabético 5% de folha de *Cissus sicyoides* L.); NDM (Não Diabético).

[a] DM5%>NDM5% (p=0,0153) e DM5%>GC (p=0,0298)

6.5.5 Avaliação Histológica

O estudo histopatológico dos 20 animais verificou que não houve influência da insulina vegetal e da Streptozotocina nos padrões fisiológicos dos tecidos estudados (coração, rim e fígado) (Figura 7).

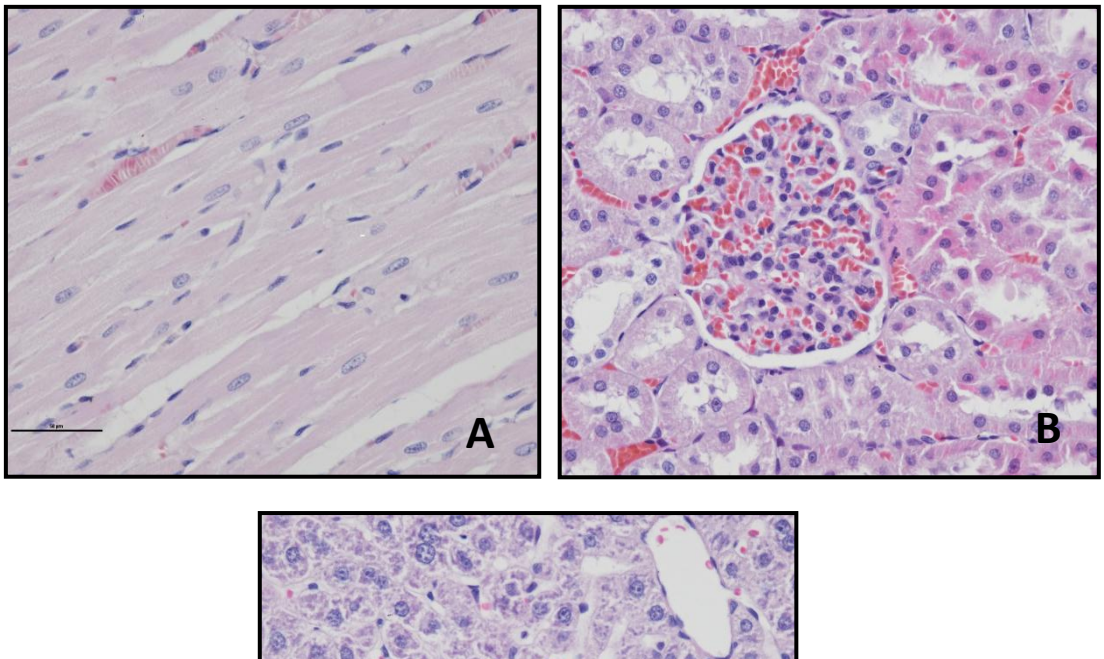


Figura 7 Padrão histológico de coração (A), rim (B) e fígado (C) de ratos *Wistar* representativos dos grupos não diabéticos. Hematoxilina e Eosina, aumento de 40x. Devido à ausência de significância, não foram exibidos os tecidos dos demais grupos.

7 DISCUSSÃO

Cissus sicyoides L. é uma das plantas com propriedades preventivas e curativas, que ainda não é muito investigada (SABAA-SRUR et al., 2012).

Ao pesquisar as determinações químico-físicas, foi observada uma escassez da literatura referida a esta planta, por isso o interesse deste trabalho foi mostrar mais informações relacionadas à insulina vegetal.

A umidade é uma das determinações fundamentais quando se trata de um alimento pronto para o consumo, pois se pode identificar o controle de qualidade relacionado à estabilidade, que pode ser afetada pelo armazenamento, embalagem e processamento (CECCHI, 2003). No presente estudo encontrou-se 87,81% de umidade inicial, valor semelhante aos encontrados por Braga e colaboradores (2007) e Junqueira (2010), os quais

encontraram o teor de umidade inicial (base úmida) 85,52% e 86,84%, respectivamente. O procedimento de secagem foi necessário, pois o alto teor de umidade pode acarretar uma baixa qualidade da matéria-prima, como por exemplo, contaminações por fungos e bactérias (AMARAL et al, 2003).

Ao avaliar a umidade das folhas de insulina vegetal parcialmente desidratadas em secador com ar aquecido à 55ºC±5ºC, foi encontrado 12,19%, assemelhando-se ao estudo de Braga (2007), que demonstrou 11,47%. A Farmacopeia Brasileira IV (1988) estabelece uma umidade entre 8 e 14%, para uma boa preservação da matéria-prima, sendo assim o dado encontrado nesta pesquisa está dentro dos parâmetros.

Lipídios são compostos presentes em muitos alimentos, sendo insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, como: éter de petróleo, éter etílico, clorofórmio e acetona. Os óleos e gorduras, bem como os carboidratos e proteínas fornecem energia ao organismo, sendo fundamental para a alimentação humana, pois fornecem sabor ao alimento, aumentam a saciedade, transportam vitaminas e estão presentes em muitas funções fisiológicas importantes (SHILS et al, 2003).

O teor de lipídio demonstrado nas folhas desidratadas de insulina, no presente estudo, foi de 6,21g/100g de amostra, diferente do encontrado no estudo de Junqueira (2010) que demonstrou 1,83g/100g de amostra. Esta desigualdade pode ter sido influenciada pela utilização de uma análise diferente para a determinação de lipídio.

As proteínas são aminoácidos ligados em longas cadeias de peptídeos que são secretadas, agindo como hormônios e citocinas. Proteínas e lipídios são usados como fonte de energia, sendo os aminoácidos diferentes dos demais substratos, pois há nitrogênio em sua estrutura. Vale lembrar que a proteína é a segunda maior reserva de energia do organismo, ficando atrás dos depósitos de gorduras. A proteína tem 20 aminoácidos, cada um tem seu destino metabólico diferenciado para diferentes vias metabólicas (SHILS et al, 2003). O valor de proteína bruta encontrada foi de 16,59%, demonstrando-se alto, mas isso foi devido ao processo de desidratação da folha, podendo estar muito concentrado, conforme Junqueira (2010) demonstrou em seu estudo. Vale ressaltar que esta planta não pode ser considerada uma fonte de proteína.

De acordo com as limitações para investigações em seres humanos, modelos experimentais são amplamente utilizados para a reprodução das sintomatologias do DM. O modelo rato albino da linhagem *Wistar* é muito utilizado, pois tem um fácil manuseio, possibilitando o trabalho com vários grupos ao mesmo tempo, possui elevada resistência a infecções, e permite a retirada dos órgãos facilmente. Relatos demonstram que estes animais induzidos ao DM se assemelham aos humanos diabéticos, demonstrando o quadro clínico, aspectos histopatológicos e laboratoriais. (GUIMARÃES, et al., 2009).

O diabetes pode ser induzido em ratos por fármacos, manipulação cirúrgica ou genética, na maioria dos experimentos os fármacos são os mais aplicados (SILVA et al, 2011). A estreptozotocina é um dos fármacos mais empregados para a indução, sendo utilizada para os estudos de diabetes tipo 1, mostrando características do quadro clínico de diabetes, como a redução na velocidade da condução nervosa, limiar da dor e fluxo sanguíneo, também pode apresentar hipoglicemia, caso permaneça sem suplementação de insulina (GUIMARÃES, et al., 2009).

O mecanismo de ação da estreptozotocina é demonstrado pela destruição das células beta pancreáticas, diminuindo a ação da insulina e causando alguma perda de peso. Estudos demonstraram uma variação da dose administrada, mas sempre acima de 40mg/kg, pela via intraperitonial (SALLES, 2011).

A hiperglicemia crônica caracterizou os grupos diabéticos, diferentemente dos grupos controles, ocorrendo o processo patogênico grave em decorrência da deficiência na produção de insulina, levando a anormalidade no metabolismo. Ao final do experimento o grupo de DM tratado com 5% de infuso de folhas de insulina vegetal demonstrou melhora na curva glicêmica, como demonstrado em estudos anteriores (BARBOSA, 2002; PEPATO E BAVIERA, 2003; VIANA et al, 2004; VASCONCELOS, 2004; VASCONCELOS et al, 2007).

A avaliação do ganho de peso dos animais permaneceu semelhante aos animais controle, apresentando também, o consumo hídrico e o consumo de ração compatíveis, sendo similar o já descrito por Carvalho et al. (2009).

Posteriormente, foi observado nos grupos induzidos com DM o sintoma poliúria, sendo este amplamente conhecido e descrito na literatura (FERREIRA et al., 2011), demonstrando um estado de hiperglicemia.

Barbosa e colaboradores (2002) demonstraram em seu estudo, que a presença de flavonóides, canferol livre encontrados em grandes quantidades no chá do extrato da folha, pode ter a atividade hipoglicemiante, já que este é um flavonol que tem como ação a diurese e a hipoglicemia. Este dado pode justificar o efeito hipoglicemiante da insulina vegetal encontrado no presente trabalho.

Os ROS desempenham um papel importante na patologia do DM e suas complicações, tendo evidências clínicas que demonstram a íntima relação com o estresse oxidativo que é combatido pela defesa antioxidante (JIANG, 2012).

A atividade antioxidante de um extrato vegetal está ligada a quantidade de compostos fenólicos totais, sendo um mecanismo de defesa contra radicais livres. Já foi descrito que a insulina vegetal possui estes compostos, assim acredita-se que pode ajudar em tratamentos contra doenças degenerativas, como o diabetes (BRAGA, 2008). Estudos com antioxidantes mostram o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, os alimentos e as plantas medicinais apresentam uma grande variedade de substâncias que podem atuar na proteção do organismo (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Além disso, há uma perspectiva no desenvolvimento de novos fitoterápicos, como terapia medicamentosa no tratamento e prevenção de doenças que cursem com o estresse oxidativo, como por exemplo, o diabetes (OLIVEIRA, et al., 2007).

Para a avaliação do efeito antioxidante da insulina vegetal, foi avaliada a atividade da enzima catalase. A catalase é uma enzima encontrada em quase todos os organismos vivos, tendo como função catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (JIANG, 2012). Os grupos não diabéticos apresentaram atividades similares da catalase, mas vale ressaltar que os animais não diabéticos e tratados com o chá de insulina vegetal tiveram uma diminuição da atividade da catalase em comparação com o grupo diabético tratado. Este resultado mostra que este chá não é benéfico em não

diabéticos. Novos estudos sobre a atividade antioxidante do chá são necessários para maiores esclarecimentos em relação ao dado encontrado.

Apesar do grupo DM mostrar uma tendência à diminuição da atividade da catalase em comparação ao grupo DM tratado com insulina vegetal, não houve diferença estatística. Talvez, a duração do experimento tenha sido insuficiente para demonstrar a diminuição da ativade da catalase nos animais diabéticos, ou seja, não houve o aumento esperado da geração de radicais livres, que são elevados após a indução de streptozotocina® (GUIMARÃES, et al., 2009). Por outro lado, o tratamento com o chá de insulina foi capaz de aumentar a atividade da catalase em animais diabéticos em comparação aos grupos não diabéticos, tratados ou não.

Este efeito da insulina vegetal na atividade sérica da catalase é inédito, pois até o presente momento, não foram encontrados artigos que referenciam estes resultados. No entanto, há poucos trabalhos que apresentam dados de atividade enzimática antioxidante, sendo tecidual e não no plasma (SIVAKUMAR & RAJAN, 2010).

Os tecidos cardíacos, renais e hepáticos dos animais dos diferentes grupos foram alterados após o tratamento com o chá. Por outro lado, Vasconcelos e colaboradores (2007) observaram hepatite e hiperplasia no fígado de camundongos submetidos à 5 g/kg via oral e 2 g/kg, via intraperitoneal, da fração aquosa das folhas de *Cissus sicyoides*. Estes achados foram discordantes devido à via de administração e da concentrações, que foram diferentes.

O uso de práticas de medicina alternativa deve ser mais estudado e discutido no mundo acadêmico, pois a população ingere os produtos empiricamente. A Equipe da família (PSF – Programa de saúde da Família) e agentes de saúde devem estar preparadas para a orientação sobre o uso dos diferentes chás. Mesmo tendo a ANVISA regulamentado para o uso de plantas medicinais da tradição popular (BRASIL, 2010 – RDC 10/2010), é necessário uma justificativa baseada em referências relevantes, isso já impulsiona mais estudos com estas plantas popularmente utilizadas pelo Brasil inteiro.

O emprego do chá de insulina vegetal para o controle do diabetes é muito difundido na população, que os utiliza sem o devido controle de qualidade e

adequado preparo deste infuso. Já foi demonstrada por alguns autores a presença de antioxidantes na composição da folha desidratada, tendo estes componentes ações de controle da glicemia contudo, mais estudos são necessários para identificar o modo de secagem, o tempo de infusão, a quantidade e o tempo de administração do chá (BELTRAME et al, 2001). Por outro lado, não parece recomendável seu uso em não diabéticos.

Também é de suma importância saber como se dá o cultivo das plantas, caso a indústria farmacêutica ou de alimentos se interesse pela industrialização. Até o momento não há registros como se realiza o cultivo de plantas para o uso medicinal, somente registros de plantio para uso em estudos, como hortos (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010).

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente trabalho, foi possível avaliar os infusos de folhas de insulina vegetal e verificar seu efeito hipoglicêmico e

antioxidante em animais diabéticos e ausência da ocorrência de lesões nos tecidos cardíacos, renais e hepáticos em animais diabéticos ou não.

Estudos pré-clínicos posteriores se fazem necessários para confirmar estes achados e contribuírem para maiores esclarecimentos sobre o uso do chá da insulina vegetal. São também necessários estudos clínicos para o uso correto e seguro desta planta.

REFERÊNCIAS

ADA (American Diabetes Association). **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Definition and description of Diabetes Mellitus**. Revista Diabetes Care, v.35, p. 64-71, 2012.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M**. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.** Revista Brasileira Farmacognosia, v.17, p.114-140, 2007.

ALBUQUERQUE, J.M.D. **Plantas medicinais de uso popular. Brasília: ABEAS**. (Programa de agricultura nos Trópicos, 6), 96p, 1989.

ALMEIDA, M.M.B; LOPES, M.F.G.; NOGUEIRA, C.M.D. **Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais.** Ciência Tecnologia Alimentos, Campinas, São Paulo, v.22, p.94-97, jan-abr, 2002.

AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S., OLIVEIRA, M.A. **Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luiz/Maranhão**. Revista Brasileira Farmacognosia, v.13, p.27-30, 2003.

ARAÚJO, A.C. et al., **Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves**. Toxicology Letters. v.151, p.481-487, 2004.

A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemists). **Official Methods of the Association of the Agricultural Chemists**. 18.ed. Washington, v 3, 2005.

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

BARREIROS, ALBS E DAVI, JM. **Estresse oxidativo relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo**. Química Nova, v.29, n.1, p.113-123, 2006

BELTRAME, F.L.; PESSINI, G.L.; DORO, D.L.; FILHO, B.P.D.; BAZOTTE, R.B.; CORTEZ, D.A.G.: **Evaluation of the antidiabetic and antibacterial activity of *Cissus sicyoides*.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2002.

BELTRAME, F.L.; SARTORETTO, J.L.; BAZOTTE, R.B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D.A.G.: **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial**

antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). Quimica Nova, v. 24, n. 6, p. 783-785, 2001.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G.; **Radicais livres e os principais antioxidants da dieta.** Revista de Nutrição. Campinas, 12: 123-130, 1999.

BRAGA, T.V.; OLEIVEIRA, T.T.; DORES, R.G.R.; NAGEM, T.J. **Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de Cissus verticillata (L.) Nicolson & C.E. Jarvis subsp. Verticillata e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada**. Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada, v. 28, p. 287-290, 2007.

BRAGA, T.V**.; Avaliação da atividade farmacológica de Cissus verticillata Nicilson & C.E. Jarvis subsp. Verticillata como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante**.2008. Dissertação (Mestrado em "Magister Scientiae"). Universidade Federal de Ouro Preto. 2008.

BRASIL, ANVISA. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n˚ 48 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial, Brasília, 2004.

BRASIL,ANVISA. Ministério da aúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 10 de 09 de março de 2010. **Dispõe sobre notificação de drogas vegetais**. Diário Oficial, Brasília, 2010.

CARDOZO, L.F.M.F.; CHAGAS, M.A.; SOARES, L.L.; TROINA, A.A.; BONAVENTURA, G.T. **Exposure to flaxseed during lactation does not alter prostate area or epithelium height but changes lipid profile in rats**. Nutrición Hospitalaria, 2010; 25: 250-255.

CARVALHO, A.C.B.; PERFEITO, J.P.S.; SILVA, L.V.C.; RAMALHO, L.S.; MARQUES, R.F.O.; SILVEIRA, D. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.47, p.467- 473, 2009.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO,E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO,J.P.S. **Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil**. Revista Brasileira de Farmacologia. 18:314-319, 2008.

CASTRO, M.S.; BARROS, N.F.; ALEGRE, S.M.; HOEHNE, E.L. **O uso de terapia alternativa e complementar por pacientes diabéticos do tipo 2**. Brasília Médica. V.47, p. 17- 25, 2010

CATANIA, AS; BARROS, CR; FERREIRA, SRG. **Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico:**

controvérsias e perspectivas. Revista Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo. v.53, n.5, p.550-559, 2009.

Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA. 12-02-2009.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª edição revisada. Campinas, SP. Editora da UNICAMP, 2003.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. **Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização**. Revista Brasileira Plantas Medicinais, 13:367-373, 2011.

DE SOUZA, AP. **Coleta e processamento de órgãos e tecidos para avaliação da infecção: coleta e processamento de órgãos para microscopia óptica**. In: ARAÚJO-JORGE, T E DE CASTR,SL. Organização de Doenças de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.265-310, 2000.

DOMINICI, A.J.C.; REGO, T.J.A.; SILVA, A.Z.; ROCHA,C.C.; LIMA, E.B. **Abordagem fitoquímica de *Cissus sicyoides* L. (vitaceae)**. In.54º Congresso Nacional de Botânica, Belém, PA, 2003.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. **Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente**. Animal de Laboratório, v.19, p.59-65, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: conceitos, doenças, sistema de defesa.** Revista da Associação Médica Brasileira, v.43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, L.T.; SAVIOLLI, I.H.; VALENTI, V.E.; ABREU, L.C. Diabetes Melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde, v.38, p. 182-188, 2011

GARCIA, M.D.; SAENZ, M.T.; PUERTA, R.; QUILEZ, A. FERNANDEZ, M.A. **Antibacterial activity of *Agave intermixta* and C*issus sicyoides* L**. Fitoterapia. V.70, p.71-73, 1999.

GROSS,J.L., NEHME,M. **Detecção e tratamento das complicações crônicas do Diabetes Melitus: consenso da Sociedade Brasileira de Dieabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia.** Revista Associação Médica Brasil, v.45, p. 279-284, 1999.

GUIMARÃES, R.R.; ORSI, M.; MELLO, M.P.; EIGENBEER, J.F.; LEITE, M.A.A.; GRIMARÃES, R.R.; QUINTANILHA, J.A.C.; NASCIMENTO, O.J.M. **Atualização em neuropatias periféricas relacionadas às alterações neurais e vasculares ocorrentes na Diabetes Mellitus em modelos animais**. Revista Brasileira de Neurologia. 45: 13-20, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.** 4ª Ed. V 1. 533p. São Paulo – SP, 2005.

International Diabetes Federation (IDF). **Diabetes Atlas**. 5, ed. 2011.

JIANG, S.; DU, P.; AN, L.; YUAN, G.; SUAN, Z. **Anti-diabetic effect of Coptis Chinensis polysaccharide in high-fat diet with STZ-induced diabetic mice.** Internetional Journal of Biologycal Macromolecules. 55:118-122, 2012.

JUNQUEIRA, P.C. **Determinação do conteúdo orgânico-mineral e avaliação do potencial antioxidante da insulina vegetal (*Cissus sicyoides* L.)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

KANG,J.X.; LEAF,A. **Prevention of fatal cardiac arrythythmias by polyunsaturated fatty acids**. The American Journal of Clinical Nutrition, v.17, p. 2002-2007, 2000.

KHALIL, N.; PEPATO, M.; BRUNETTI, I.L. **Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficate* and *Cissus sicyoides*.** Revista da Biologia, v. 41, p. 165-171, 2008.

KUSKOSKI, E.M; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. **Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas**.Ciência Rural, v.36, p.1283-1287, 2006.

LIMA, A. **Caracterização, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação do compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar Brasiliense*, Camb.).** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.

LIMA, W.Q.F., PEREIRA, T.C.D. **Avaliação fito química e antioxidante de plantas medicinais do Norte do Mato Grosso**. FACIDER – Revista Científica, v.2, n.2, 2013

LOMBARDI, J.A. **O gênero *Cissus* L. emend descoings (Vitaceae) na América do Sul.** Campinas, SP: USP, 355p. (tese), 1994.

LOMBARDI, J.A. **Vitaceae: gêneros Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. Flora neotropica monograph 80**. New York Botanical Garden Bronx, New York, USA, 2000.

LORENZI, H. et. al. **Palmeiras Brasileiras e Exóticas Cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2004.

MACIEL, M.A.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** Quimica Nova, v.25, p. 429-438, 2002.

MARINHO, M.G.S; CESSE, E.A.P.; BEZERRA, A.F.B.; SOUZA, I.M.C.; CARVALHO,E.F. **Análise de custos da assistência à saúde aos portadores de diabetes melito e hipertensão arterial em uma unidade de saúde pública de referência em Recife-Brasil**. Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo, v.55, p.406-411,2010.

MAZZANTI, C.M. **Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo**. Ciência Rural, v.33, p. 1061-1065, 2003.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, G.O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MURTHY, K.N.C.; VANITHA, A.; SWAMY, M.M.; RAVISHANKAR, G.A. **Antioxidant and antimicrobial activity of *Cissus quadrangularis* L.** Journal of Medicinal Food, v. 6, p. 99-105, 2003.

OMS - World Health Organization. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation**. Geneva, World Health Organization, 59p., 1999.

OMS - World Health Organization. **Study group on diet, nutrition and prevention of chronic diseases.** Geneva, 1990.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Programa de Diabetes**. Disponível em: http://www.who.int/diabetes/action.online/basics/en/index.html, 21/01/2013.

PAIVA, E.A.S.; BUONO, R.A.; LOMBARDI, J.A**. Food bodies in Cissus verticillata (Vitaceae): ontogenesis, structure and functional aspects**. Annals of Botany. v. 103, p. 517-524, 2009.

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

PRESGRAVE, O.A.F., **Membros da comissão de ética no uso de animais – CEUA/Fiocruz**. Manual de utilização de animais/Fiocruz, 2008.

REIS, J.S. **Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no Diabetes tipo I.** Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica, v.52, p. 1096-1105, 2008.

REEVES,PG; NIELSEN, FH; FAHEY,GC. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute Ad Hoc eriting Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet**. Journal Nutrition, v.123,n.10,p. 939-1951, 1993.

ROSA, C.; CAMARA, S.G.; BERIA, J.U. **Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde**. Ciência e Saúde Coletiva, v.16, p.311-318, 2008.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PEREZ-JIMENEZ,J. SAURA-CALIXTO, F.D. **Comunicado Técnico** on line.1:1-4, 2007.

SABAA-SRUR,AUO; JUNQUEIRA,PC; LEAL, AS; SILVA, MC. **Determination of the percent composition and mineral contente of the leaves of the insulin plant (*Cissus sicyoides*) with the goal of including it in the usual diet.** The Natural Products Journal,v.2,p.111-113,2012.

SALES, A.L.C.C.; **Efeito de suplementação com aveia, linhaça, gergelim, semente de girassol e jatobá sobre parâmetros relacionados ao Diabetes *Melittus* em ratos**. 97f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Piauí. Terezina, PI. 2010.

SANTOS, H.B.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M.F.F.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; PEREIRA, F.S.B.; RAMALHO, J.A.; DANTAS, J.G.; SANTOS, E.B. **Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, p. 70-76, 2008.

SANTOS, R.L., Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no SUS. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 13, p. 486-491, 2011.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. **Consenso Brasileiro Sobre o Diabetes: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito tipo 2.** Rio de Janeiro, 75 p., 2002.

SENGER, A.E.V., CARLA, H.A., SCHWANKE, M.G.V.G. **Chá verde (*Cameleia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônica não transmissíveis**, v.20, p. 292-300, 2011

SILVA, G.A.; ARAÚJO, L.C.L.; OGA, S.; AKISUE, G. **Estudo toxicológico e farmacológico dos extratos fluídos de *Cissus sicyoides* L**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.5, p. 143-155, 2006.

SILVA, G.A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; AKISUE, G.; FERRO, V.O. **Padronização dos extratos de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) e identificação de carotenos**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.1, p. 96-112, 1996.

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

SILVA, L.; ONIKI, G.H.; AGRIPINO, D.G.; MORENO, P.R.H.; YOUNG, M.C.M.; MAYWORM, M.A.S.; LADEIRA, A.M. **Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de Cissus verticillata (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae)**. Revista Brasileira Farmacognosia, v.17, p.361-367, 2007.

SILVA, M.; LIMA, W.G.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L. **Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmicos e lipídicos e o estresse oxidativo em hamsters**. Arquivo Brasileiro Endocrinologia e Metabolismo,v. 55, p. 46-53. 2011.

SIVAKUMAR, V.; RAJAN, M.S. **Antioxidant Effect of Tinospora cordifolia Extract in Alloxan-induced Diabetic Rats**. Indian Journal Pharmaceutical Sciences, v.72, p. 795-798, 2010.

SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. Manole, São Paulo, 2003.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. **Métodos para a determinação da atividade antioxidante em frutas**. UNOPAR – Científica Ciências Biológicas e Saúde, v. 14, p. 263-269, 2012

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Editora Fiocruz, 2010.

TOP-TROPICALS. www.toptropicals.com, acesso:08/02/2013.

VASCONCELOS, T.H.C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M.F.F.M.; SANTOS, H.B.; AGUIAR, F.B.; MOREIRA, P.V.L. **Estudos toxicológicos pré-clínicos agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, p.583-591.2007.

VIANA, G.S.B.; MEDEIROS, A.C.C.; LACERDA, A.M.R.; LEAL, K.A.M.; VALE, T.G.; MATOS, F.J.A. **Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides***. BMC pharmacology, v. 4, p.9, 2004.

WILD,S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING,H. **Global Prevalence of Dioabetes – Estimates for the year 2000 and projetions for 2030**, v.27, p.1047-1053, 2004.

ZUANAZZIC,J.A.S. E MAYORGA, P. **Fitoprodutos e desenvolvimento econômico**. Química Nova, v. 33, p.1421-1428, 2010.

ANEXO

ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 11 de Abril de 2012

Prezado Professor Armando Ubirajara de O. Sabaa Srur

A Comissão de Ética com uso de animais (CEUA) em Experimentação Cientifica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"Determinação do valor nutricional e avaliação dos efeitos hipoglicêmicos de infuso de folhas de insulina vegetal (Cissus sicyoides) em Ratos Adultos"**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência **INJC012.**

Atenciosamente;

Prof. Paulo de Assis Melo
Presidente da CEUA - CCS
Comissão de Ética com Uso
de Animais em Pesquisa do CCS

Prof. Paulo Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

Decania do CCS: Av.Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar - Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br

ANEXO 2 – CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO ANIMAL

Cronograma Exp. Insulina

Data	Dia semana	dpi	Atividade	Responsável
05/07/2012	quinta	-8	pesagem e separação em grupos	Adriana
06/07/2012	sexta	-7		Adriana
07/07/2012	sabado	-6		Adriana
08/07/2012	domingo	-5		Adriana
09/07/2012	segunda	-4		Adriana
10/07/2012	terça	-3	Preparar o Citrato no Fundão	Adriana
11/07/2012	quarta	-2		Adriana
12/07/2012	quinta	-1	jejum 12 horas	Adriana
13/07/2012	sexta	0	pesagem / Indução DM / coleta sanguínea pela cauda	Adriana
14/07/2012	sabado	1		Adriana
15/07/2012	domingo	2		Adriana
16/07/2012	segunda	3	confirmação do DM / início do chá	Adriana
18/07/2012	terça	4		Adriana
19/07/2012	quarta	5	chá	Adriana
20/07/2012	quinta	6		Adriana
21/07/2012	sexta	7	chá	Adriana
22/07/2012	sabado	8		Adriana
23/07/2012	domingo	9		Adriana
24/07/2012	segunda	10	chá	Adriana
28/07/2012	terça	11		Adriana
29/07/2012	quarta	12	Chá	Adriana
30/07/2012	quinta	13	pesagem / jejum 6 horas / Coleta sanguínea	Adriana
31/07/2012	sexta	14	chá	Adriana
01/08/2012	sabado	15		Adriana
02/08/2012	domingo	16		Adriana
03/08/2012	segunda	17	chá	Adriana
04/08/2012	terça	18		Adriana
05/08/2012	quarta	19	chá	Adriana
06/08/2012	quinta	20		Adriana
07/08/2012	sexta	21	chá	Adriana
09/08/2012	sabado	22		Adriana
10/08/2012	domingo	23		Adriana
11/08/2012	segunda	24	chá	Adriana
12/08/2012	terça	25		Adriana
13/08/2012	quarta	26	chá	Adriana
14/08/2012	quinta	27	pesagem / jejum 6 horas / Coleta sanguínea	Adriana
15/08/2012	sexta	28	chá	Adriana
16/08/2012	sabado	29		Adriana
17/08/2012	domingo	30		Adriana
18/08/2012	segunda	31	chá	Adriana
19/08/2012	terça	32		Adriana

20/08/2012	quarta	33	jejum 12 horas	Adriana
21/08/2012	quinta	34	pesagem / Sacrifício e coleta de órgãos	Adriana

ANEXO 3

The Natural Products Journal, 2012, 2, 111-113

Determination of the Percent Composition and Mineral Content of the Leaves of the Insulin Plant (*Cissus sicyoides*) with the Goal of Including it in the Usual Diet

Armando U. O. Sabaa-Srur[a,*], Patrícia de C. Junqueira[b], Adriana Leal[c] and Márcia C. da Silva[d]

[a]*Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil;* [b]*Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) and Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brazil;* [c]*Centro Universitário Augusto Motta (UNISUAM), Rio de Janeiro, Brazil;* [d]*IFRJ, Brazil*

Abstract: Leaves from the insulin plant (*Cissus sicyoides*) were analyzed and found to have 89.08±1.87% water, 1.85±0.05% protein and 0.83±0.02% lipid. The lipid fraction has a high percentage of linolenic acid, an essential fatty acid. The fatty acid composition was 35.1% linolenic, 16.0% linoleic, 5.2% oleic, 26.3% palmitic, 7.7% stearic acids and 3.4% unidentified fatty acids. The quantity of ash was of 1.35±0.04%. By difference, the level of carbohydrate was 6.89%. The most minerals were calcium, magnesium, manganese, potassium and selenium, at concentrations of 50501, 4644, 21.2, 11161 and 0.24 mg/kg, respectively.

Keywords: *Cissus sicyoides*, insulin, diabetes, linolenic acid.

INTRODUCTION

Many plants with important properties for the prevention and/or cure of diseases have been cultivated and used for centuries by humans, in the form of infusions or incorporated into the diet [1]. In Brazil, there are many plants with these properties. Some have been studied and the effects described [2]. Others, such as *Cissus sicyoides* have not been well-studied [3].

The genus *Cissus* is the largest member of the family Vitaceae, which has about 350 species distributed in the Americas, Asia and Australia. The species *Cissus sicyoides* has several synonyms, such as *Cissus Verticillata* (L.), *C. latifólia Descourt*, *C. tinctoria M* and others [4]. This species, which is found in the Amazon region is popularly known as "insulina", "anil trepador", "cipó-pucá", "cortina japonesa" and "uva branca" [5]. Despite the lack of research, the leaves are used externally to treat rheumatism and cure abscesses. Extracts of the leaves and stem are used to treat inflammation, epilepsy, stroke, hypertension and diabetes *mellitus*. So, it is popularly known as the insulin plant [6-8].

This is a climbing plant. It adapts easily to the climactic conditions of the tropics and subtropics. It is found in the area west of Rio de Janeiro. During harvest season, the leaves and fruits are picked. Despite this, the leaves are not widely consumed, even though they are used by some people in traditional remedies [9].

Considering the lack of studies on the insulin plant, the objective of this work was to determine the percent composition and amount of minerals in the leaves with the view of including it in the usual diet.

MATERIALS AND METHODS

Leaves of the insulin plant were collected in local farms west of Rio de Janeiro between August and December, 2008. They were transported to the laboratory for the processing of food in the Department of Nutrition at the Federal University of Rio de Janeiro. After collecting them, the leaves were macerated and immersed in distilled water at room temperature for 15 min to wash off dirt particles. Next, the leaves were taken out of the water and shaken to drain off as much of the water as possible. Afterwards, the leaves were dried in a ventilated oven at 50±5°C for 24 hrs to dry them as much as possible. They were stored in plastic bags and frozen at -18°C until analyzed.

Aliquots of the leaves *in natura* were used to determine moisture content. Prior to performing quantitative analyses, the frozen bags were removed from the freezer and thawed out over 24 hrs in a refrigerator. All determinations were done in triplicate.

The levels of humidity, protein, ash and lipids were obtained in accordance with the method described by the Adolfo Lutz Institute [10]. Total carbohydrates were determined by difference, after subtracting the percentages of moisture, ash, seed, lipids and proteins from 100%. The caloric content was calculated based on the percentages of lipids, proteins and carbohydrates, using the conversion factors of 9 kcal/g for lipids (fats) and 4 kcal/g for proteins and carbohydrates [11].

*Address correspondence to this author at the Department of Basic and Experimental Nutrition, Nutrition Institute, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373 Rio de Janeiro, RJ -21941-902, Brazil; Tel: (55) 21 25626449; Fax: (55) 21 92430875;
E-mail: sabaasrur@gmail.com.br

2210-3163/12 $58.00+.00 © 2012 Bentham Science Publishers

ANEXO 4

From: **Nutrición Hospitalaria** <info@nutricionhospitalaria.com>
Date: 2013/2/7
Subject: Envío de Artículo al sistema para Revisión
To:

El siguiente Original se ha enviado al sistema para su Revisión
The following article has been received for evaluation

Código/Code :	6482
Título/Title :	Los efectos de la ingesta de Cyssus Sicyoides beber en la masa corporal, glucemia y los parámetros de fémur en ratas macho.
Autor/Author :	Paula, Paula Cristina Alves da Silva

Para más información póngase en contacto con / For more information, please contact
info@nutricionhospitalaria.com