

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Caracterização química e avaliação do potencial antidiabético e
citotóxico de óleo extraído de *Acrocomia aculeata* (macaúba)**

Perla Villani Borges da Silva

Dourados
Mato Grosso do Sul
Março – 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Caracterização química e avaliação do potencial antidiabético e
citotóxico de óleo extraído de *Acrocomia aculeata* (macaúba)**

Perla Villani Borges da Silva
Orientadora: Prof^ª. Dra. Rozanna Marques Muzzi
Coorientadora: Prof^ª. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL, no Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados - Área de concentração: Tecnologia Ambiental”

Dourados
Mato Grosso do Sul
Março - 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Caracterização química e avaliação do potencial antidiabético e
citotóxico de óleo extraído de *Acrocomia aculeata* (macaúba)**

Autora: Perla Villani Borges da Silva
Orientadora: Prof^a. Dra. Rozanna Marques Muzzi
Coorientadora: Prof^a. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya

TITULAÇÃO: Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental - Área de
concentração: Tecnologia Ambiental

APROVADA em ___/___/___ pela banca examinadora:

Prof^a. Dra. Isabel Craveiro Moreira
Membro examinador - UTFPR

Prof^a. Dr. Rodrigo Juliano de Oliveira
Membro examinador - UFMS

Prof^a. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya
FCS/UFGD (coorientadora)

Prof^a. Dra. Rozanna Marques Muzzi
FACET/UFGD (Orientadora)

“Não há tempo certo para se fazer o que tem que ser feito, o tempo está na mente de cada um de nós e para fazer basta estar vivo. O poder da verdade não está na evidência dos fatos, mas na sabedoria que cada ser humano que passa pela sua vida lhe demonstra. Terminei mais este fazer no tempo que considere ser o momento certo nesta minha etapa de vida”.

(Perla Villani)

AGRADECIMENTOS

À vida por me proporcionar mais este momento divino, que me fez crescer mais um pouco. À minha família, principalmente meu marido Renato Garrido, que com toda paciência esteve presente em todos os momentos desta etapa em que precisei dele. Ao meu filho, Rafael, que mesmo sendo muito pequeno para entender me motivou a mais esta conquista. À minha mãe, Irma, que mesmo de longe, sempre com muito amor e carinho acreditou mais uma vez em mim. Ao meu pai, Manoel, que sempre me dá força quando se tem que estudar: “meu amigo querido, não deu para ele ter este privilégio de fazer o seu mestrado, mas dedico este título a você”. Ao meu segundo pai, Gilvan, que sempre acreditou na minha força seja onde quer que eu esteja e tem grande orgulho disso. Aos meus irmãos, Lisa e Douglas que me têm como exemplo espero não desapontá-los. Aos meus sogros, Lili e Marcial, que com grande carinho demonstraram interesse pelo meu trabalho. Aos meus queridos amigos do Mato Grosso do Sul, Francieli Crivelaro, Luiz Gonzaga Manzini, Magaiver Andrade, Elaine Avellar, Patrícia Jonas Cardoso cada qual com a sua participação nesta etapa, me fez ter um grande motivo para fazer valer a distância de exatos 145 Km de minha casa até o ambiente de trabalho. Aos meus grandes amigos cariocas, Jennifer Lowe, Nilson Nunes, Marcelo Einicker, Janaína Machado, Renata Vilela, Monique Correia, por acreditarem que eu deveria cumprir mais esta etapa que estava há muito pendente em minha vida.

À minha orientadora Dra. Rozanna Marques Muzzi, por ter me dado um voto de confiança mesmo não me conhecendo e posso dizer que agora a considero não só a minha professora como também uma grande amiga. Agradeço a orientação no trabalho científico, que atendeu muito as minhas expectativas e a orientação psicológica que me deu forças para continuar e com grande serenidade.

À professora Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya, que tive o grande prazer de conhecer e conviver já no final de meu trabalho, mas que foi muito importante

para que eu pudesse concluí-lo com grande êxito. Agradeço as suas observações que foram cruciais para conclusão de determinados pontos do trabalho.

Ao professor Dr. Antônio Jorge Vieira, NPPN-UFRJ, por prontamente e gentilmente me disponibilizar um espaço na utilização dos cromatógrafos e demonstrar interesse em ajudar na interpretação dos cromatogramas.

À técnica de laboratório de Cromatografia Cristina Holanda, do NPPN-UFRJ, pela paciência e pelos dias dedicados as minhas análises.

À professora Dra. Jennifer Lowe, IBCCF-UFRJ, que além de grande amiga foi minha grande professora no manuseio celular e dos animais, sem você a indução do diabetes com estreptozotocina não teria o mesmo êxito.

Ao professor Dr. Marcelo Einicker, IBCCF-UFRJ, por ter me dado todo o suporte no tratamento celular com seu aluno de Doutorado Rafael Lindoso, além de ser um grande amigo, primo e sempre acreditar na minha capacidade.

Ao professor Dr. Adalberto Vieyra, IBCCF-UFRJ, por ter me recebido com grande carinho e disposição nos três meses de trabalho científico no Rio de Janeiro e ao aluno de doutorado Rafael Lindoso que me ensinou muito sobre cultura celular.

À minha querida e eterna orientadora Prof^a Dra. Aida Hassón-Voloch, *in memoriam*, onde quer que você esteja dedico muito desse título aos seus ensinamentos e disciplina, que nos fizeram aprender de verdade como trabalhar em qualquer laboratório de pesquisa.

Aos estagiários de meu laboratório de pesquisa, em especial a Willian Corrêa e Priscila Vinholi, pelo trabalho bem feito, vontade de aprender, e dedicação mesmo sendo nos finais de semana. Sem vocês com certeza o óleo não seria o mesmo, agradeço a disponibilidade que fizeram a nossa pesquisa acontecer!

À querida Edna Kassuya, UFGD, pela grande ajuda ao trabalho desenvolvido com os ratos, que foi primordial para que o trabalho fosse bem desenvolvido, muito obrigada!

Sem esquecer, é claro, do Prof. Dr. Gustavo Fonseca, UFGD, por ter cedido seu laboratório para o término de alguns experimentos e aos técnicos de laboratório da Universidade Federal da Grande Dourados, pelo carinho e dedicação.

À empresa de ônibus Expresso Maringá pelos descontos nas passagens de Dourados à Naviraí, sem vocês não teria conseguido durante três vezes na semana me deslocar até minha cidade.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pelo prazer de me proporcionar um estudo de meu interesse com pessoas que passam pela minha vida deixando marcas que ficarão presentes para sempre. OBRIGADA!

BIOGRAFIA DO AUTOR

PERLA VILLANI BORGES DA SILVA, filha de Manoel Borges da Silva e Irma Villani de Mattos de Almeida, nasceu na cidade do Rio de Janeiro, RJ, no dia 27 de Outubro de 1973.

Em 1999 concluiu a pesquisa de Iniciação Científica e Aperfeiçoamento Científico, como bolsista do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) sob orientação da Dra Aida Hassón-Voloch, Laboratório de Físico-Química Biológica, IBCCF-UFRJ.

Em fevereiro de 1999 concluiu o curso de Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Em março de 1999 inicia o trabalho como Farmacêutica Responsável pela Farmácia de Manipulação e Indústria de Cosmético Dermatus (RJ), como gerente técnica em desenvolvimento galênico.

Em março de 2000 inicia curso de aperfeiçoamento industrial, área de validação e garantia de qualidade, na Universidade de Chicago, onde reside e estuda durante 6 meses.

Em agosto de 2000 chega à França onde reside por 1 ano e meio e inicia curso de aperfeiçoamento fitoterápico, homeopático e aromático pelas Universidades de Paris e Genebra em fevereiro e março de 2001.

Em fevereiro de 2002 inicia trabalho como Coordenadora de HTS (High-Throughput Screening), no setor de enzimas, na empresa Extracta Moléculas Naturais S.A. com cooperação a Glaxo Smithkline, no rastreamento de 10.500 extratos que fazem parte da Mata Atlântica e Floresta Amazônica como potentes alvos para desenvolvimento de fármacos. Este trabalho se concluiu em outubro de 2002 com a descoberta de 10 novas moléculas potenciais como possíveis fármacos.

Em outubro de 2002 inicia trabalho na PhD Farmácia de Manipulação (RJ) como Gerente de Produção e Desenvolvimento Galênico.

Em fevereiro de 2006 inicia trabalho ainda na PhD Farmácia de Manipulação como Diretora de Marketing e Pesquisa e Desenvolvimento, ministrando ainda aulas para pós-graduação em Medicina Ortomolecular para Medicina pela Universidade Veiga de Almeida desde 2004.

Em março de 2007 conclui trabalho na PhD Farmácia de Manipulação e inicia trabalho com Analista de Novos Negócios e Prospecção Técnico-Científica na área de Vacinas, Reativos Diagnósticos e Biofármacos pela empresa Biomanguinhos-Fiocruz, RJ.

Em maio de 2008 conclui o curso de pós-graduação Lato senso MBA em Gestão de Negócios, pela Instituição Ibmecc-RJ.

Em fevereiro de 2009 conclui trabalho na empresa Biomanguinhos-Fiocruz e inicia trabalho pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul- Unidade Naviraí, como professora de Bioquímica e Química Ambiental para Faculdade de Química, este trabalho é concluído em Dezembro do mesmo ano.

Em fevereiro de 2010 inicia o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, em nível de Mestrado, área de concentração Tecnologia Ambiental, na Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, pela Universidade Federal da Grande Dourados, realizando estudos na área de conhecimento em química orgânica.

Participação e apresentação dos resultados em eventos científicos da área:

“Transesterificação do óleo da macaúba (*Acrocomia aculeata*) em diferentes graus de acidez” – 4º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel e 7º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel – Belo Horizonte, 2010.

“Caracterização dos óleos obtidos da polpa e da amêndoa da macaúba” - 34ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA – Florianópolis, 2011.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
AG	Ácido Graxo
ANP	Agência Nacional de Petróleo de Gás Natural
CG/DIC	Cromatografia Gasosa/Detector Ionização por Chama
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplado à espectrometria de massa
DHA	Ácido decosaheptaenóico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro Padrão da Média
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KOH	Hidróxido de Potássio
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LLC-PK1	Linhagem de células renais epiteliais originalmente derivadas de rins de porco
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAA	Óleo da Polpa do fruto de <i>Acrocomia aculeata</i>
PGA	Produtos Finais de Glicosilação Avançados
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilglicerol
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplificações de algumas sinonímias apresentadas para a macaúba.	10
Tabela 2. Condições de Análise do CG/EM.	22
Tabela 3. Condições de Análise do CG/DIC.	22
Tabela 4. Distribuição dos animais experimentais nos ensaios de indução de diabetes, tolerância a glicose e toxicidade aguda.	23
Tabela 5. Rendimento, índice de acidez e rendimento de transesterificado de óleos obtidos de <i>A. aculeata</i> (macaúba).	31
Tabela 6. Composição dos ácidos graxos da polpa de <i>A. aculeata</i> (macaúba), obtida na 1ª coleta e na 2ª coleta, por CG/EM.	36
Tabela 7. Composição dos ácidos graxos da amêndoa de <i>A. aculeata</i> (macaúba), na obtida 1ª coleta e na 2ª coleta, por CG/EM.	37
Tabela 8. Composição dos ácidos graxos da polpa de <i>A. aculeata</i> (macaúba), obtida na 2ª coleta, por CG/DIC.	39
Tabela 9. Peso corporal (g) de ratos NAIVE (não diabético, não induzido), diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE), diabético induzido tratado com OPAA na dose de 3 mg/Kg (OPAA 3 mg/Kg) e diabético induzido tratado com OPAA na dose de 30 mg/Kg (OPAA 30 mg/Kg) durante os 38 dias do experimento.	49
Tabela 10. Consumo diário de líquido (mL) e de ração de ratos NAIVE (não diabético, não induzido), diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE), diabético induzido tratado com OPAA na dose de 3 mg/Kg (OPAA 3 mg/Kg) e diabético induzido tratado com OPAA na dose de 30 mg/Kg (OPAA 30 mg/Kg) durante os 38 dias do experimento.	50

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A. Vista geral da palmeira *A. aculeata*; B. Base da bainha foliar coberta de espinhos compridos (Fonte: Ramiro, 2010). 11
- Figura 2.** A. Cachos com frutos de macaúba. B. Macaúba produzindo vários cachos de frutos (Fonte: Ramiro, 2010). 11
- Figura 3.** A. epicarpo do fruto; B. mesocarpo de coloração amarelada; C. amêndoas inteiras; D. amêndoas seccionadas ao meio, com destaque para o endocarpo (Fonte: Ramiro, 2010). 12
- Figura 4.** Distribuição da espécie *A. aculeata* pela América Tropical (Fonte: Nucci, 2007).. 13
- Figura 5.** Comparação da capacidade de produção de óleo vegetal entre algumas oleaginosas (Fonte: Nucci, 2007)..... 15
- Figura 6.** Composição aproximada de ácidos graxos nos óleos de mesocarpo e amêndoa de *A. aculeata* (Fonte: Fortes & Baugh, 1999 – adaptado.)..... 16
- Figura 7.** Óleo extraído por solvente da polpa e da amêndoa de *A. aculeata*. 20
- Figura 8.** Material transesterificado do óleo da polpa de macaúba e do óleo da amêndoa de *A. aculeata* 21
- Figura 9.** Reação de transesterificação dos óleos vegetais, onde R representa as cadeias carbônicas dos ácidos graxos..... 32
- Figura 10.** Espectro de infravermelho do óleo bruto da polpa de *A. aculeata* - 2ª coleta (-OBP) e do material transesterificado (-OTP). 34
- Figura 11.** Espectro de infravermelho do óleo bruto da amêndoa de *A. aculeata* - 2ª coleta (-OBA) e do material transesterificado (-OTA)..... 35
- Figura 12.** Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da polpa de *A. aculeata*, 1ª coleta. 36
- Figura 13.** Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da polpa de *A. aculeata*, 2ª coleta.. ... 37
- Figura 14.** Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da amêndoa de *A. aculeata*, 1ª coleta.38
- Figura 15.** Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da amêndoa de *A. aculeata*, 2ª coleta.38
- Figura 16.** Cromatograma obtido por CG/DIC do óleo da polpa de *A. aculeata*, 2ª coleta. ..40
- Figura 17.** Viabilidade das células LLC-PK1 em cultura (em número de células mortas) medida pela exclusão do iodeto de propídio após incubação de 3, 6 e 18 h com diferentes concentrações de OPAA 5, 50, 250 e 500 µg/mL. Cada barra representa a média com n = 2 e as linhas verticais mostram o DP (* $p < 0,05$)..... 41
- Figura 18.** Gráfico de ABS x Tempo, referente ao crescimento de *S. cerevisiae* frente às diferentes concentrações de OPAA em relação ao controle e veículo em diferentes tempos de incubação (3, 6, 22, 24 e 27 h)..... 43
- Figura 19.** Efeitos do tratamento oral com OPAA sobre o aumento dos níveis de glicose no diabetes Mellitus do Tipo 1 induzido por estreptozotocina nos diferentes grupos de ratos, nas doses de 3 mg/kg, e 30 mg/kg, comparados aos grupos diabético tratado com veículo (CONTROLE) durante 24 dias e não-diabético não-tratado (NAIVE). Os dados foram representados pela média e as linhas verticais demonstram o \pm DP (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$)..... 44

Figura 20. Níveis plasmáticos de colesterol total em ratos *Wistar* no 38º dia do experimento, nos grupos de ratos Naive, diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE), Diabético tratado com OPAA nas doses de 3 mg/Kg e 30 mg/Kg. As barras representam as médias \pm DP da concentração de colesterol total (* $p < 0,05$)..... 46

Figura 21. Níveis plasmáticos de triglicerídeos em ratos *Wistar* no 38º dia do experimento, nos grupos de ratos Naive, diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE), Diabético tratado com OPAA nas doses de 3 mg/Kg e 30 mg/Kg. As barras representam as médias \pm DP da concentração de colesterol total..... 48

Figura 22. Efeito do OPAA no teste de tolerância à glicose no 5º dia de experimento em diferentes grupos de ratos normoglicêmicos tratados por administração oral do veículo (CONTROLE); OPAA na dose de 3 mg/Kg e Cloridrato de metformina 300 mg/Kg. Cada barra representa a média e as linhas verticais demonstram o \pm DP (* $p < 0,05$)..... 51

RESUMO

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. (macaúba) é uma espécie comum de palmeira, economicamente importante, encontrada no cerrado, abundante no Estado de Mato Grosso do Sul. Plantas do gênero *Acrocomia* são reconhecidas tradicionalmente na alimentação e medicinalmente por tratar doenças inflamatórias e cardiovasculares. Extratos da raiz do gênero *Acrocomia* demonstraram potencial efeito na atividade antidiabética. O óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* possui composição química semelhante ao azeite de oliva, indicando possuir compostos bioativos que podem agir na prevenção e no controle de diabetes. Assim, investigou-se nesse trabalho, o potencial antidiabético de óleos vegetais presentes nos frutos de uma espécie desse gênero, popularmente conhecida como macaúba. Recentemente seu potencial começou a ser descoberto pelas indústrias de cosméticos e de alimentos. Os óleos da amêndoa e fruto da macaúba foram obtidos por extração, caracterizado por técnicas cromatográficas e espectroscópicas e, o efeito antidiabético do óleo da polpa foi avaliado. O óleo da polpa do fruto da *A. aculeata* (OPAA) foi avaliado em modelo antidiabético em ratos (diabetes induzido por estreptozotocina) e sinais de toxicidade foram investigados tanto em testes *in vivo* como *in vitro*. Nenhum sinal de toxicidade foi verificado pelo teste de toxicidade aguda com dose de 3 g/kg ou pelo ensaio de citotoxicidade em células LLC- PK1 com concentrações de 5 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL and 500 µg/mL do material testado. A administração oral de OPAA (3 mg/kg), diminuiu significativamente os altos níveis de glicose induzido por estreptozotocina, em ratos. Além disto, em ratos normoglicemicos, a administração oral de OPAA (3 mg/kg), diminuiu significativamente os níveis de glicose. Os níveis séricos de colesterol total foram investigados, ao final do experimento, a fim de se avaliar possíveis alterações bioquímicas, onde foi observado uma redução no colesterol total nos ratos tratados com OPAA (30 mg/kg) em relação ao controle. O mesmo não foi observado quanto a alteração dos níveis de triglicérides, em relação aos diferentes grupos tratados em relação ao controle. Os resultados sugerem que OPAA possui atividade antidiabética e efeitos hipoglicemiantes na concentração de 3 mg/Kg, sem toxicidade *in vivo* ou *in vitro*.

Palavras - chave: diabetes, macaúba, óleo, ratos, estreptozotocina, hipoglicemiante.

ABSTRACT

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. (macauba) is a comum species of palm, economically important, found in Cerrado, abundant in the state of Mato Grosso do Sul. Plants from *Acronomia* genus are recognized in Brazilian food and traditional medicine to treat the cardiovascular and inflammatory diseases. Extracts from the root of genus *Acrocomia* demonstrated potential in antidiabetic activity. The pulp oil of *Acrocomia aculeata* has a similar chemical composition to olive oil, indicating possess bioactive compounds that may act in the prevention and control of diabetes. Thus, this study investigated the antidiabetic potential of vegetable oils in the fruits of a species of this genus, popularly known as macauba. Recently began its potential to be discovered by the industries of cosmetics and foods. The pulp and kernel oil of macaúba were obtained by extraction, characterized by cromatografies and spectrografics methods and, the antidiabetic effect of pulp oil was available. The pulp and kernel oils of macauba fruit were obtained by extraction, and characterized by spectroscopic and chromatographic techniques, the antidiabetic effect of the pulp oil was evaluated. The fruit's pulp *A. aculeata* palm oil (PAAPO) was evaluated for antidiabetic model in rat (streptozotocin-induced diabetes) and signs of toxicity were investigated by in vivo and in vitro tests of toxicity. No signs of toxicity were verified in acute toxicity with doses of 3 g/kg or in LLC- PK1 cells citotoxicity assay with 5 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL and 500 µg/mL concentrations of the test material. The oral administration of PAAPO (3 mg/kg), significantly decreased the high glucose levels induced by streptozotocin in rats. Additionally, in normoglycemic animals, the oral administration of PAAPO (3 mg/kg), significantly decreased the glucose levels. Serum levels of total cholesterol were investigated at the end of the experiment in order to evaluate possible biochemical abnormalities, where it was observed a reduction in total cholesterol in rats treated with OPAA (30 mg / kg) compared to control. The same was not observed for the alteration in triglyceride levels, in relation to different treatment groups compared to control. The results suggest that PAAPO possess anti-diabetic and hypoglicemiant effects with 3 mg/Kg concentration without *in vivo* or *vitro* toxicity.

Key - words: diabetes, macauba, oil, rats, streptozotocin, hypoglicemiant.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Introdução Geral.....	1
1.2. Plantas medicinais	2
1.3. Papel dos ácidos graxos na saúde.....	3
1.4. Cerrado.....	7
1.5. <i>Acrocomia aculeata</i>	9
1.5.1. Macaúba: Uso da espécie X Produção de óleo vegetal	13
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Local do experimento.....	19
3.2. Estudos fitoquímicos: Extração, Análise Físico-Química e Química do Óleo.....	19
3.2.1. Extração do óleo de <i>A. aculeata</i>	19
3.2.2. Forma de armazenamento dos óleos	19
3.2.3. Análise Química do óleo extraído e transesterificado: determinação do índice de acidez.....	20
3.2.4. Transesterificação do óleo extraído da polpa e da amêndoa de <i>A. aculeata</i>	21
3.2.5. Caracterização dos ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho	21
3.3. Estudos farmacológicos/Ensaio biológicos	23
3.3.1. Animais	23
3.3.2. Drogas, Sais e Reagentes	24
3.3.3. Equipamentos.....	24
3.3.4. Ensaio de citotoxicidade e toxicidade.....	25
3.3.4.1. Preparo da amostra.....	25
3.3.4.2. Ensaio de citotoxicidade em cultura celular.....	25
3.3.4.2.1. Determinação da viabilidade celular	25
3.3.4.3. Ensaio de toxicidade em leveduras (Cepa W303 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	26
3.3.4.3.1. Determinação da viabilidade da cepa.....	26
3.3.4.4. Teste de toxicidade aguda (dose única) do óleo da polpa de <i>A. aculeata</i> por via oral <i>in vivo</i> ..	26
3.3.5. Ensaio biológicos.....	27
3.3.5.1. Modelo de indução de Diabetes <i>Mellitus</i> do Tipo 1 por estreptozotocina em ratos.....	27

3.3.5.1.1. Determinação de colesterol total sérico.....	28
3.3.5.1.2. Determinação de triglicérides.....	28
3.3.5.1.3. Determinação do peso dos animais	29
3.3.5.1.4. Determinação do consumo de água e ração dos animais	29
3.3.5.2. Determinação do teste de tolerância à glicose em ratos <i>Wistar</i> normoglicêmicos do óleo da polpa de <i>A. aculeata</i>	29
3.4. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1. Estudos fitoquímicos: Extração, Análise Química e Caracterização dos Óleos.....	31
4.1.1. Extração dos óleos de <i>A. aculeata</i>	31
4.1.2. Transesterificação do óleo extraído da polpa e da amêndoa de <i>A. aculeata</i>	32
4.1.3. Análise química do óleo extraído e transesterificado: determinação do índice de acidez.....	33
4.1.4. Composição química dos óleos e análise de FT-IR	33
4.1.4.1. Análise de FT-IR.....	33
4.1.4.2. Análise de CG/EM	35
4.1.4.3. Análise CG/DIC	39
4.2. Estudos farmacológicos/Ensaio biológicos	41
4.2.1. Ensaio de citotoxicidade em cultura celular.....	41
4.2.2. Ensaio de toxicidade em leveduras (Cepa W303 – <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	42
4.2.3. Teste de toxicidade aguda (dose única) do óleo da polpa de <i>A. aculeata</i> por via oral <i>in vivo</i>	43
4.2.4. Modelo de indução de Diabetes <i>Mellitus</i> do Tipo 1 por estreptozotocina em ratos	44
4.2.4.1. Determinação de colesterol total sérico.....	45
4.2.4.2. Determinação de triglicérides.....	48
4.2.4.3. Determinação do peso dos animais	48
4.2.4.4. Determinação do consumo de água e ração dos animais	49
4.2.5. Determinação do teste de tolerância à glicose em ratos <i>Wistar</i> normoglicêmicos do óleo da polpa de <i>A. aculeata</i>	50
5. CONCLUSÕES.....	53
5.1 Considerações finais.....	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. ARTIGO.....	59

1 - INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

O diabetes *mellitus* do tipo 1 é uma doença metabólica crônica caracterizada pela deficiência de insulina, a qual é determinada em função da destruição das células produtoras de insulina do pâncreas (ilhotas de Langerhans). Esse processo, mediado pelo sistema imunológico, ocasiona um quadro permanente de hiperglicemia o qual é característico da doença e que tem um impacto significativo sobre a saúde, a qualidade de vida, a expectativa de vida do paciente e sobre o sistema público de saúde (ALSALEH *et al.*, 2012).

Além disso, existem alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, assim como alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos. Relata-se ainda que o único tratamento que se tem para essa doença é a reposição de insulina e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1995), em 2025 o mundo terá 300 milhões de pessoas afetadas com a doença, sendo a Índia o país mais afetado. A medicina tradicional se volta para as plantas, que têm um papel mais como adjuvante do que como agente principal no combate e tratamento desta doença (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

As plantas medicinais são prescritas amplamente, principalmente no Oriente, devido a sua eficácia, segurança (por apresentar poucos efeitos colaterais) e baixo custo no tratamento de diabetes. Dessa forma, tem-se pesquisado vários compostos importantes de plantas medicinais, onde um estudo detalhado demonstra que as moléculas ativas oferecem uma ampla biblioteca para a farmácia do futuro no tratamento de diabetes do Tipo 1. Sabendo-se que durante a hiperglicemia há um grande aumento dos níveis de glicose nos tecidos, e dentre os órgãos mais afetados estão o globo ocular, a retina e o rim e os tecidos dos nervos periféricos, os efeitos colaterais ocasionados pelo excesso de glicose devem ser a chave destes possíveis compostos (SRIVASTAVA *et al.*, 2011).

Outras complicações decorrentes do diabetes do Tipo 1 são a geração de radicais livres, o estresse oxidativo e a glicação de proteínas (HAMDEN *et al.*, 2009). De forma que, nesse caso, atividade antioxidante e antiglicosilação de proteínas são importantes para garantir a eficácia no mecanismo de ação hipoglicemiante.

A Macaúba, regionalmente também conhecida como Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) é uma espécie que pertence à família Palmae, abundante e nativa no Estado de Mato Grosso do Sul. Outras espécies do gênero ocorrem não somente nesse estado, mas também no Sudoeste

do Brasil assim como na América Central. Atualmente essas espécies vêm despertando a atenção principalmente da indústria farmacêutica, pois as frutas em geral, contêm diferentes compostos fitoquímicos (muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes e antiinflamatórias) como óleos insaturados que podem relacionar-se ao retardo do envelhecimento e à prevenção de certas doenças degenerativas em seres humanos e óleos saturados com ação emoliente e cicatrizante (COIMBRA, 2011).

Durante os últimos anos podemos citar numerosos dados etnobotânicos referentes às Palmas e a sua utilização farmacológica, um deles referente à utilização da raiz de *A. mexicana* pelos povos indígenas nos estados de Yucatán e Tamaulipas no México para tratamento de diabetes. A partir desses dados compostos hipoglicemiantes foram isolados e testados farmacologicamente *in vivo* para confirmar esta atividade (PÉREZ *et al.*, 1997). Sabendo-se da composição dos frutos da macaúba, onde se destaca a presença de grande concentração de ácidos graxos monoinsaturados, principalmente de ácido oléico (HIANE *et al.*, 2005), não encontramos relatos na literatura sobre estudos de sua ação farmacológica, incluindo atividade hipoglicemiante e antidiabética.

Alguns estudos de caracterização físico-química já foram publicados referentes ao fruto da macaúba e podemos destacar como principal exemplo da família de alimentos funcionais por apresentar similaridade na composição de óleos, o azeite de oliva, cujos principais componentes são os ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico ou ômega 9) (COIMBRA, 2011).

1.2 Plantas medicinais

A utilização das plantas como medicamento é tão antiga quanto o próprio homem, onde inúmeras etapas marcaram a evolução da arte de curar. Porém, é difícil determiná-las com exatidão, já que a medicina há muito tempo foi associada a práticas mágicas, místicas e ritualísticas (RODRIGUES, 2001).

O uso de plantas medicinais, como métodos populares de cura, demonstra que o seu uso vem desde o homem pré-histórico, que aprendeu a utilizá-la como alimento e remédio, até o homem moderno, que ainda nos dias de hoje a utiliza de modo seguro e eficiente. Desde 1999 o uso da fitoterapia é enormemente difundido e considerado um método natural preventivo, conservador, regenerador e curativo (YWATA, 1999).

A atuação do governo na área de plantas medicinais e fitoterápicos destaca-se desde 2006 com a elaboração da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que

estabeleceu diretrizes para implementações de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira e no uso seguro e eficiente da fitoterapia. Esse decreto constitui parte essencial no que concerne às políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. Embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais, sendo então verificado o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Além disso, o Brasil possui um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, o que favorece o estudo técnico-científico baseado na etnobotânica. Alguns princípios nortearam a elaboração desta Política Nacional de Produtos Naturais, tais como a melhoria da atenção à saúde, o uso sustentável da biodiversidade brasileira, o fortalecimento da agricultura familiar, a geração de emprego e renda, o desenvolvimento industrial e tecnológico e a perceptiva de inclusão social e regional (Ministério da Saúde, Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006).

O estudo técnico e científico de plantas com potencial terapêutico e econômico para produção de medicamentos é o primeiro passo para que um trabalho multidisciplinar seja feito, visando estabelecer quais são as espécies vegetais promissoras para pesquisas, justificando-se assim seu uso e sua conservação (RODRIGUES, 2001). Promovendo dessa forma a ideia de uso sustentável, quanto ao desenvolvimento da cadeia produtiva de plantas medicinais (agricultura familiar), o incentivo à pesquisa, o desenvolvimento de tecnologias e inovações com estes recursos, o fortalecimento da indústria farmacêutica nacional e a busca por opções terapêuticas seguras e eficazes no uso destas plantas.

1.3 Papel dos ácidos graxos na saúde

Os lipídeos são de extrema importância na alimentação e no desenvolvimento humano. Além disso, fornecem ácidos graxos que são constituintes estruturais de membrana celulares, cumprem funções energéticas e de reservas metabólicas, formam hormônios e sais biliares. Dentre os ácidos graxos, existem aqueles que o organismo tem capacidade de síntese e outros não. Esses ácidos graxos, cuja biossíntese não é possível no organismo, são denominados ácidos graxos essenciais, tais como os ácidos graxos poliinsaturados - linoléico (ω -6) e alfa-linolênico (ω -3), que têm como principal função o transporte de vitaminas com características lipossolúveis e antioxidantes (A, D, E e K) (PHILIPPI, 2008).

Os ácidos graxos insaturados são classificados em duas categorias principais: (I) Poliinsaturados representados pelas séries ômega-6 (linoléico e araquidônico) e ômega-3 (alfa-linolênico, eicosapentanoico-EPA e decosahaxaenóico-DHA) e (II) monoinsaturados representados pela série ômega-9 (oléico). Os ácidos graxos poliinsaturados - linoléico e alfa - linolênico são considerados essenciais uma vez que não são sintetizados pelo ser humano, devendo ser obtidos diariamente pela dieta. Ambos são utilizados como substratos dos demais ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-6, cujas fontes alimentares são os óleos vegetais de soja, milho e girassol. Além disso, os ácidos graxos essenciais são imprescindíveis ao organismo, uma vez que fazem parte dos fosfolipídios de membranas, especialmente das mitocôndrias e são precursores na biossíntese de prostaglandinas específicas, tromboxanos e leucotrienos, importantes mediadores da resposta imunológica e inflamatória. A ausência ou a quantidade inadequada de tais ácidos graxos na dieta está associada principalmente a distúrbios neurológicos, visuais e dérmicos (escamações e inflamações na pele) (PHILIPPI, 2008).

A relação de ácidos graxos poliinsaturados recomendados, ω -6 e ω -3 na dieta é de 5:1, para se ter uma razão tecidual de ácido araquidônico por ácido eicosapentaenóico na síntese de eicosanóides, que são substâncias imunorreguladoras importantes e também conhecidos como hormônios parácrinos ou locais, com diversas funções fisiológicas no sistema cardiovascular, reprodutivo, respiratório, renal, endócrino e imune. Os ácidos graxos poliinsaturados possuem o inconveniente de induzir maior oxidação lipídica e diminuir o HDL-colesterol quando utilizados em grande quantidade. Os ácidos graxos ômega-3 (linolênico, EPA e DHA) são encontrados nos vegetais (soja, canola e linhaça) e em peixes de águas frias (cavala, sardinha, salmão, arenque). Promovem redução dos triglicérides plasmáticos pela diminuição da síntese hepática de VLDL, podendo ainda exercer outros efeitos cardiovasculares, como redução da viscosidade do sangue, maior relaxamento do endotélio e também efeitos antiarrítmicos (SIMOPOULOS, 2000).

Além dos ácidos graxos poliinsaturados, que são ácidos graxos com duas ou mais duplas ligações, temos os ácidos graxos monoinsaturados, que são ácidos graxos com uma única dupla ligação, como exemplo principal tem-se o ácido oléico (ω -9). Suas principais fontes dietéticas são o óleo de oliva (50%), o óleo de canola, a azeitona, o abacate, as oleaginosas (amendoim, castanhas, nozes, amêndoas) e também o óleo da polpa de macaúba (65%) (BERGOUIGNAN *et al.*, 2009).

O seu consumo na dieta está relacionado com a estabilidade do metabolismo do colesterol, pois contribui para redução do LDL colesterol e a manutenção do nível do HDL,

de modo a auxiliar na prevenção da hipertensão e arteriosclerose. Além disso, possuem ação antioxidante, reduzem o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica. Os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados diminuem os níveis de colesterol total, LDL – colesterol, quando os ácidos graxos saturados são substituídos pelos ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados, ou quando na dieta são consumidos juntos na proporção de 1:1:1, reduzem assim os riscos de doenças coronarianas (NAGARAJU, 2007).

Sabe-se também que dietas ricas em ácido oléico, afetam favoravelmente o balanço entre ômega-6 e ômega-3, aumentando ômega-6 e diminuindo ômega-3 na membrana de células sanguíneas vermelhas em indivíduos saudáveis (BERRY, 1997).

Além de prevenir e auxiliar a hipertensão e arteriosclerose, os ácidos graxos monoinsaturados, agem no diabetes por suas propriedades antioxidantes (que são mais potentes do que os ácidos graxos poliinsaturados), reduzindo a resistência à insulina e consequentemente diminuindo os níveis de glicemia no sangue, de modo a melhorar as condições alteradas do quadro (BERGOUIGNAN *et al.*, 2009).

No diabetes a atividade antioxidante também está relacionada aos danos ocasionados por radicais livres (como estresse oxidativo e modificações lipídicas e protéicas), atuando contra oxidações catalisadas e induzidas por metais de transição (BERRY, 1997). Também está relacionada à prevenção do envelhecimento e na atividade antiglicante de proteínas, de modo que não só tem efeito protetor e tonificante na pele como também auxilia no tratamento da catarata, doença comum no paciente diabético (OMS, 1995).

Segundo Reaven (1997), a hiperglicemia também é responsável pela liberação de produtos finais de glicosilação e estes produtos são responsáveis por etapas intermediárias na formação de proteínas glicosiladas e que envolvem radicais livres. Este processo foi denominado glicooxidação e pode ainda predispor LDL à oxidação. Esta glicooxidação se dá por uma ligação covalente não-enzimática da glicose a proteínas estruturais, plasmáticas e intracelulares, que podem alterar o metabolismo e/ou a função, destas proteínas. Em uma via proposta de glicosilação, a glicose inicialmente se liga à proteína porém de uma base de *Schiff* reversível, que lentamente se reorganiza para formar produtos estáveis Amadori, bem como produtos finais de glicosilação (radicais livres). Uma via alternativa de glicosilação de proteínas (glicosilação autooxidativa) também tem sido proposto que envolve a enolização direta de glicose, formando cetoaldeídos, que podem então ligar-se diretamente a grupos de lisina em proteínas, gerando assim produtos de radicais livres. A peroxidação lipídica acelera a glicosilação de proteínas no diabetes, de modo que vários estudos recentes apóiam a suplementação com agentes antioxidantes, como ácidos graxos monoinsaturados, β -

carotenóides e α -tocoferóis, para que desta forma ocorra uma diminuição da glicosilação de proteínas (principalmente lisina-proteases) e consequente peroxidação lipídica, que representam as grandes complicações do diabetes (REAVEN, 1997).

Renaud (1997) afirma que existem consideráveis evidências e numerosos estudos em humanos e animais que sugerem uma estreita relação entre o consumo de gorduras saturadas e colesterol com morbidade e mortalidade por doença arterial coronariana. Porém, uma dieta associada a ácidos graxos insaturados, principalmente os monoinsaturados, levam a uma redução do colesterol (por reduzirem a susceptibilidade do LDL isolado de oxidar, diminuindo a extensão de arteriosclerose, isto se dá pelo fato do LDL oxidado ser citotóxico e liberar moléculas quimiotáticas para monócitos e linfócitos T), além de prevenir a resistência a insulina no diabetes, que ocorre via palmitato e por alta ingestão de ácido graxo saturado (BERGOUIGNAN *et al.*, 2009). Essa proteção à sinalização de insulina, parece estar associada ao oleato, já que este converte palmitato em TAG, não deixando-o disponível para causar resistência à insulina. Assim o acúmulo de TAG no músculo e no fígado leva a uma ativação da beta-oxidação na mitocôndria, o que explica o efeito protetor ácido oléico no diabetes (BERGOUIGNAN *et al.*, 2009).

Os conhecimentos atuais a respeito do metabolismo dos lipídeos demonstram que a digestão, a absorção, o transporte e a distribuição desses compostos são eventos complexos, e que os antioxidantes têm papel importante para a manutenção da saúde. Cita-se também que, a ingestão dos difetentes ácidos graxos têm influência marcante no metabolismo lipídico, sendo muito importante na composição das lipoproteínas e na produção de eicosanóides (NELSON, 1992). Considera-se a quantidade recomendada para cada indivíduo, os alimentos-fonte devem ser diariamente escolhidos para compor a dieta e proporcionar saúde e prazer ao se alimentar (PHILIPPI, 2008).

Devido às suas propriedades antioxidantes, por reduzirem a resistência à insulina e pela consequente diminuição dos níveis de glicema no sangue (BERGOUIGNAN, 2009), decidiu-se investigar as propriedades biológicas do óleo oriundo da polpa de macaúba, que além de ser rico em ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico), possui em sua composição outros potentes agentes antioxidantes como β -caroteno e α -tocoferol, derivados das vitaminas A e E. Muitos estudos vêm sendo realizados para investigar as propriedades biológicas dos óleos oriundos tanto da polpa como da amêndoa da macaúba, relacionando estruturalmente a atividade. Para que ocorra assim a incorporação deste fruto como fonte oleaginosa e alimento funcional é necessário investimento para a pesquisa e desenvolvimento desde a produção

agrícola até a geração de produtos finais, de forma a se estabelecer uma cadeia produtiva para essa espécie do cerrado.

O consumo de uma dieta balanceada segundo Geraldo & Alfenas (2008), sugerem que seja capaz de reduzir os níveis de marcadores inflamatórios, favorecendo a produção de citocinas antiinflamatórias, contribuindo para a prevenção ou o controle do diabetes e de outras condições metabólicas relacionadas à manifestação de doenças crônicas não transmissíveis. Desta forma, podemos incorporar na dieta o fruto do Cerrado, a macaúba, que apresenta importante qualidade nutricional ou até mesmo utilizá-lo em uma formulação farmacêutica tal como um xarope ou como suplemento antioxidante.

1.4 Cerrado

O Cerrado brasileiro é reconhecido como uma das 25 áreas do mundo prioritárias para conservação e como a savana mais rica em biodiversidade com a presença de diversos ecossistemas. Este bioma é o 2º maior do Brasil e ocupa 2 milhões de km² do território, percorrendo 14 estados, sendo a região Centro-Oeste a área de maior predominância. Faz fronteira com Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Pantanal. Com uma fauna e flora extremamente rica, esta região possui cerca de 10.000 espécies vegetais (aproximadamente 400 espécies de plantas/hectare) e 1.600 espécies de animais (MAURO, 2004).

O bioma é composto de dois estratos principais: um superior formado por árvores relativamente baixas (de até 20 metros) e arbustos com raízes profundas que lhes permitem atingir o lençol freático, situado entre 15 a 20 metros; e um inferior composto por um tapete de gramíneas de aspecto rasteiro, com raízes pouco profundas, no qual a intensidade luminosa que as atinge é alta. Seu clima característico é composto por duas estações principais, uma extremamente quente e seca e a outra extremamente úmida e chuvosa (IBAMA, 2008; SILVA *et al.*, 1994).

Com o incentivo governamental de ocupação do Cerrado na década de 1970, começou então a ocorrer uma mudança gradativa na paisagem, tendo em vista que a cobertura da vegetação nativa começou a ser derrubada para a introdução de pecuária extensiva (áreas extensas de pastagens), que hoje é a base principal de economia da região Centro-Oeste (ALMEIDA *et al.*, 1998). Esta região então foi invadida por agricultores de várias partes do país, a maioria sem conhecimento prévio das características do ecossistema da área de ocupação. O desconhecimento do potencial de uso dos recursos naturais, o desrespeito às leis de proteção ambiental (ainda muito frágeis na década de 70), as extensas queimadas e a

intensidade de exploração agrícola provocou e ainda provoca prejuízos irreparáveis ao solo, à fauna, à flora e aos recursos hídricos, colocando em risco essa região e comprometendo a sustentabilidade desse ecossistema (SILVA, 2001).

Diante desse cenário, apresentar o potencial de uso e a importância socioeconômica dessas espécies para a pesquisa nacional, contemplando a Política Nacional, é a estratégia mais racional para garantir a sua preservação (SILVA, 2001).

A maior fonte de recursos naturais do Cerrado são os frutos oleaginosos (HIANE *et al.*, 1992; MATUDA & MARIA NETTO, 2005) e podemos destacar dentre eles os mais conhecidos como: Pequi, Buriti, Araticum, Baru, Cagaita, Guavira e é claro o objeto desse estudo a Bocaiúva. Esses óleos vegetais extraídos desses frutos são utilizados na sua grande maioria em produtos industrializados comestíveis, compreendendo hoje mais de 90% de produção (99 milhões de toneladas). Além dos frutos, outro recurso de destaque no Cerrado são as inúmeras espécies de leguminosas arbóreas, que também são utilizadas na alimentação (PENTEADO, 2003).

Como forma de valorizar e preservar esses recursos naturais e sabendo-se que existem ainda frutos nativos da região Centro-Oeste que não foram estudados, faz-se necessário a rigor o estabelecimento da sua real composição e de seus possíveis benefícios e/ou malefícios para a o uso humano, em termos de eficácia e segurança. Além disso, essas espécies de frutos são consideradas fonte de proteínas, fibras, energia, vitaminas, cálcio, fósforo e ácidos graxos na alimentação (SILVA *et al.*, 1994; SANO & ALMEIDA, 1998).

Podemos destacar dentre as espécies de frutos oleaginosos do Cerrado a *Acrocomia aculeata* (macaúba), que vem despertando grande interesse na comunidade científica não só pelo seu uso alimentício, energético (como biodiesel) e cosmético, como também pelo seu potencial econômico, tendo em vista a grande presença de óleo em seu fruto (REIS *et al.*, 2009).

1.5 *Acrocomia aculeata*

Em meio às diferentes fontes vegetais da biodiversidade nacional encontram-se as palmeiras, que estão presentes em todo o território brasileiro com um grande número de espécies distintas que, com grande valor e multiplicidade de seus produtos desempenham diferentes papéis na economia brasileira. Dentre as palmeiras espalhadas pelo território brasileiro podemos destacar as mais conhecidas como: o dendezeiro (*Elaeis guineensis*), o assaieiro (*Euterope oleracea*), o coqueiro da Bahia (*Cocus Syagnus*) e o macaubeiro (*Acrocomia aculeata*). Essas são fontes ricas em compostos fundamentais, tais como vitaminas, sais minerais, carboidratos, lipídios, proteínas e são também fontes de energia promissora para o desenvolvimento e fornecimento dos vários setores racionais de produção do ponto de vista natural, econômico e ecológico (RODRIGUES, 2007).

As palmeiras são rotineiramente utilizadas como alimento pelo homem na forma de palmito, frutos e até produtos elaborados como doces, bebidas e óleos (LIMA *et al.*, 2003).

As espécies genericamente conhecidas como palmeiras pertencem à família Arecaceae, antes denominada Palmae. A palavra palma é de origem remota. Os povos itálicos aplicavam-na à tamareira (*Phoenix dactilifera* L.) da África Mediterrânea e do Oriente Médio. Os gregos chamavam-na *fóinix*, palavra de origem fenícia (LORENZI *et al.*, 1996).

Dentre à família Arecaceae, destaca-se o gênero *Acrocomia* (originado das palavras gregas “Akros” (uma) e “kome” (cabeleira), que é composto por duas espécies – *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *A. hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn - que diferem basicamente no tamanho de suas palmeiras, sendo a primeira de maior porte (HENDERSON *et al.*, 1995). A espécie *A. aculeata* foi primeiramente descrita por Jacquin em 1763 tendo como basônimo *Cocos aculeatus* Jacq.. Foi inserida por Martius no gênero *Acrocomia*, em 1824, sendo designada então como *Acrocomia sclerocarpa* e posteriormente, em 1845, Loddiges coloca ambos em sinonímia, designando-a como *Acrocomia aculeata* (MISSOURI, 2005). Atualmente, a *A. aculeata* apresenta diversas sinonímias que estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplificações de algumas sinonímias apresentadas para a macaúba.

<i>Acrocomia aculeata</i> apresenta as seguintes sinonímias	
<i>Acrocomia antiguana</i> L.H. Bailey	<i>Acrocomia antioquiensis</i> Posada-Arango
<i>Acrocomia belizensis</i> L.H. Bailey	<i>Acrocomia christopherensis</i> L.H. Bailey
<i>Acrocomia chunta</i> Covas & Ragonese	<i>Acrocomia erisacantha</i> Barb. Rodr.
<i>Acrocomia fusiformis</i> Sweet	<i>Acrocomia glaucophylla</i> Drude
<i>Acrocomia grenadana</i> L.H. Bailey	<i>Acrocomia hospes</i> L.H. Bailey
<i>Acrocomia ierensis</i> L.H. Bailey	<i>Acrocomia intumescens</i> Drude
<i>Acrocomia karukerana</i> L.H. Bailey	<i>Acrocomia lasiospatha</i> Mart.
<i>Acrocomia media</i> O.F. Cook	<i>Acrocomia mexicana</i> Karw. Ex Mart.
<i>Acrocomia microcarpa</i> Barb. Rodr.	<i>Acrocomia mokayayba</i> Barb. Rodr.
<i>Acrocomia odorata</i> Barb. Rodr.	<i>Acrocomia panamensis</i> L.H. Bailey
<i>Acrocomia pilosa</i> Leon	<i>Acrocomia quisqueyana</i> L.H. Bailey
<i>Acrocomia sclerocarpa</i> Mart.	<i>Acrocomia sclerocarpa</i> var. <i>wallaceana</i> Drude
<i>Acrocomia spinosa</i> (Mill.) H.E. Moore	<i>Acrocomia subinermis</i> León ex L.H. Bailey
<i>Acrocomia totai</i> Mart.	<i>Acrocomia ulei</i> Dammer
<i>Acrocomia viegasii</i> L.H. Bailey	<i>Acrocomia vinifera</i> Oerst.
<i>Acrocomia wallaceana</i> (Drude) Becc.	<i>Bactris globosa</i> Gaertn.
<i>Cocos aculeatus</i> Jacq.	<i>Cocos fusiformis</i> Sw.

Fonte: Henderson *et al.*, 1995

A *A. aculeata* é conhecida popularmente no Brasil como macaúba, macujá, mocujá, macaíba, macaiúva, bacaiúva, bocaiúva, umbocaiúva, imbocaiá, coco-de-catarro ou coco-de-espinho (LORENZI, 1992). O nome popular da palmeira varia também em outros países e, portanto, pode ser conhecida como Mbocayá (Argentina), totaí (Bolívia), corozo (Colômbia, Venezuela), tamaco (Colômbia), coyol (Costa Rica, Honduras, México), corosse (Haiti). Também se registram como nomes populares desta espécie: macaw palm, macaya, groo groo, grugru palm, corosse, mbocayá, cobrush, coquito, mocayá, catey, cayara, cayiete, ocori, palma de vino, gri-gri, mucajá e grou grou (MISSOURI, 2005; FRUITS FROM AMERICA, 2005).

A. aculeata habita áreas abertas e com alta incidência solar, adapta-se a solos arenosos e com baixo índice hídrico. Porém, desenvolve-se melhor em locais onde há solos férteis. As palmeiras se apresentam com caule simples e cilíndrico de 10 a 15 metros de altura (20 a 30 cm de diâmetro), coberto pelas bases com folhas de característica plumosa, associada a espinhos, principalmente em plantas jovens. Possui de 10 a 30 folhas por planta, irregularmente dispostas, com flores na base dos ramos, de coloração amarelo-claro e com seus frutos dispostos em cachos. As Figuras 1 e 2 ilustram a palmeira da *A. aculeata*, bainha e frutos.



Figura 1 - A. Vista geral da palmeira *A. aculeata*; B. Base da bainha foliar coberta de espinhos compridos (Fonte: Ramiro, 2010).



Figura 2 - A. Cachos com frutos de macaúba. B. Macaúba produzindo vários cachos de frutos (Fonte: Ramiro, 2010).

A frutificação da *A. aculeata* se dá após quatro a seis anos do plantio e ocorre durante todo o ano, porém o amadurecimento dos frutos se dá no período de Setembro a Março (ALMEIDA *et al.*, 1998). A palmeira produz em média de dois e oito cachos, com cerca de 400 frutos por cacho, numa média anual de 70 a 80 Kg de cocos, ininterruptamente por cinco ou sete meses. Os frutos se apresentam de forma esférica, globular com epicarpo lenhoso de coloração verde-amarelado (3,5 a 5 cm de diâmetro). O mesocarpo (polpa) tem característica fibrosa e mucilaginosa, com sabor adocicado, de coloração amarelado (frutos

maduros) ou amarelo esbranquiçado (frutos verdes), comestível e de aroma agradável (LORENZI, 2006). O endocarpo é fortemente aderido ao mesocarpo, com parede rígida e enegrecida e a amêndoa oleaginosa, comestível e revestida de uma fina camada de tegumento. Cada fruto contém, geralmente, uma semente envolvida por endocarpo duro e escuro com aproximadamente 3 mm de espessura (ALMEIDA *et al.*, 1998). A Figura 3 ilustra partes específicas dos frutos da *A. aculeata*.



Figura 3 - A. epicarpo do fruto; B. mesocarpo de coloração amarelada; C. amêndoas inteiras; D. amêndoas seccionadas ao meio, com destaque para o endocarpo (Fonte: Ramiro, 2010).

A distribuição geográfica da *A. aculeata* pela América Tropical é ampla, estendendo-se do Pará até São Paulo, Rio de Janeiro (região de florestas tropicais) e região Centro-Oeste, principalmente em áreas de vegetação aberta (cerrados, mata semidecíduas e florestas conturbadas) (LORENZI, 2006).

A Figura 4 apresenta a distribuição da *A. aculeata* pela América Tropical.

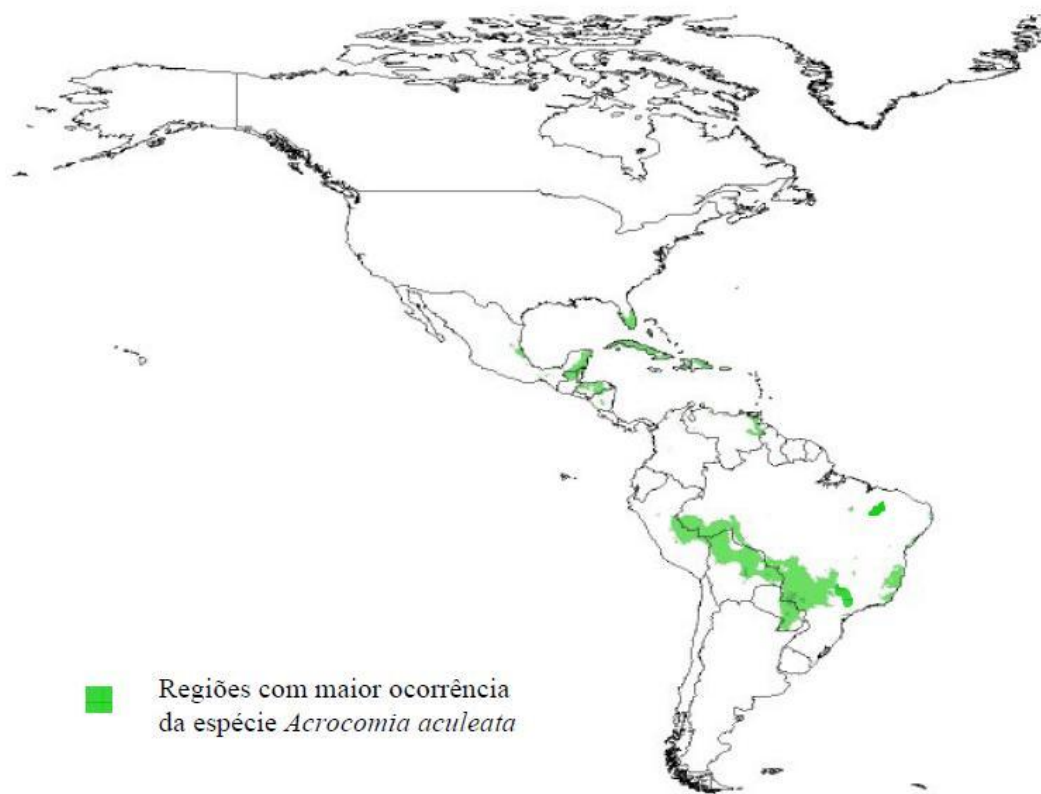


Figura 4. Distribuição da espécie *A. aculeata* pela América Tropical (Fonte: NUCCI, 2007).

1.5.1 Macaúba: Uso da espécie X Produção de óleo vegetal

No âmbito de levantamento etnobotânico realizado na região do Pantanal Mato-grossense por Lorenzi (2006) diferentes categorias de uso foram identificadas como associadas às distintas partes do corpo vegetal de *A. aculeata* sendo: 1) madeira para produção de mourões e estacas; 2) o estipe para obtenção do palmito e da seiva utilizados, respectivamente, como alimento e bebida; 3) as folhas para forragem animal, cobertura de casa e extração de fibras usadas na fabricação de linha de pesca e redes; 4) os espinhos como substituto de agulha para coser; 5) os frutos como alimento *in natura*, para obtenção da polpa com a qual é preparado um poderoso fortificante indicado contra pneumonia, sorvetes e licor ou, ainda, para extração do óleo que é utilizado como óleo de cozinha, hidratante capilar e combustível para geração de energia; 6) a semente parte lignificada (endocarpo duro e espesso) como substituto da brita no concreto, confecção de botões, pode ser utilizado para produzir combustível pelo seu alto poder calorífico; 7) a amêndoa como alimento (coquinho) e no preparo de paçoca (coquinho triturado mais farinha de mandioca) e, também, para extração do óleo o qual é utilizado tanto como alimento, combustível e/ou cosmético.

Durante os últimos anos podemos citar numerosos dados etnobotânicos referentes às Palmas e sua utilização farmacológica. Seu uso pelos indígenas resume-se na ingestão da polpa para amenizar as dores de cabeça e nevralgias, além de seu efeito purgativo em jejum. Porém, ainda há um grande desconhecimento de possíveis efeitos biológicos benéficos. Com a polpa e a amêndoa podemos destacar ainda uma emulsão empregada, com bons resultados no tratamento das afecções das vias respiratórias, o que lhe valeu a denominação de “coco-de-catarro” (ALMEIDA, 1998).

O óleo da amêndoa de macaúba também pode ser usado para fins cosméticos hidratantes e retardador do envelhecimento cutâneo, na forma farmacêutica de emulsão, isto devido ao fato da riqueza de lipídeos reparadores e reconstitutivos (patente submetida sob número PI0705949-3 A2, 2007, por Eduardo Ramirez Asquieri). Na indústria os óleos da polpa e da amêndoa podem ser empregados tanto na fabricação de sabão como para combustível.

Seu fruto tem grande potencial para produção de biodiesel, devido ao fato de que após 4-5 anos de seu plantio sua produção se dá com duas colheitas anuais com grande produtividade visto que, essa oleaginosa produz até 5 ton/ha/ano de óleo, valor comparável ao dendê e superior ao obtido com a soja (10 vezes mais na mesma área de plantio), girassol e mamona. Soma-se ainda outras características como necessidade de pouca água, aproveitamento dos espaços desocupados entre as palmeiras com plantios intercalares de outras oleoginosas (preservando a área para outros cultivos) e garantia de fixação de famílias no campo (pois a macaúba exige trabalho manual para ser colhida) (LLERAS & CORADIN, 1985). Além do grande potencial do óleo como biodiesel, os subprodutos gerados podem também ser utilizados como suplemento animal, devido aos seus altos teores de proteínas e fácil digestibilidade, permitindo assim sua utilização em ração animal (LORENZI, 2006).

A macaúba, nativa de regiões semi-áridas, se destaca por ser uma palmeira altamente produtiva, de modo que outras reservas de palmáceas como dendê, indaiá e babaçu, apresentam-se também muito promissoras pelo alto rendimento energético por unidade cultivada, e por se desenvolverem em áreas competitivas com a agricultura de subsistência. A título de comparação, deve ser citado que culturas anuais como a soja produzem apenas 420 L de óleo/ha, o girassol 890 L de óleo/ha, a mamona 1.320 L de óleo/ha e a macaúba de 1.500-5.000 L de óleo/ha, o que torna a macaúba a segunda maior produtividade em oleoginosas, ficando atrás apenas do dendê (figura 5). Isso faz com que esta espécie de palmeira ganhe destaque devido a seu grande potencial para a produção de biodiesel (CESAR, 2003). A produção extrativa dos frutos da macaubeira está na categoria 8.0 de plantas oleoginosas.

Entretanto, sem importância econômica nas regiões de ocorrência (IBGE, 2009). A Figura 5 mostra a comparação da capacidade de produção de óleo vegetal da macaúba em relação a outras oleaginosas.

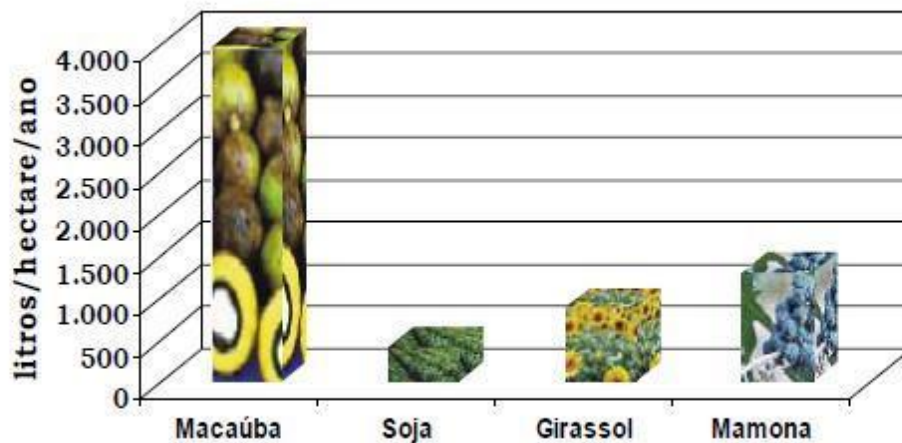


Figura 5. Comparação da capacidade de produção de óleo vegetal entre algumas oleaginosas (Fonte: NUCCI, 2007 - adaptado).

Do fruto da macaúba pode-se explorar tanto a polpa como a amêndoa, que atualmente é cada vez mais valorizada no mercado nacional e internacional, pois trata-se de um óleo de altíssima qualidade e seu potencial começou a ser descoberto pelas indústrias de cosméticos e de alimentos (CIPRIANO, 2006). As amêndoas apresentam alto teor de lipídio (51,7%), proteína (17,6%) e fibra (15,8%). A polpa contém em média 49% de umidade, 1,7% de minerais totais (dentre eles cálcio, ferro, zinco, cobre e potássio), 17% de lipídios, 2% de proteínas (dentre eles destacamos grande concentração de β carotenóides e α tocoferóis) e 31% de carboidratos totais. O perfil de ácidos graxos do óleo da polpa da macaúba é composto majoritariamente de monoinsaturados, onde sobressai o alto teor de ácido oléico, aproximadamente 73% de ácidos graxos, que o aproxima de óleos como o de oliva, amendoim e girassol. Já o óleo da amêndoa além do alto teor em ácido láurico, apresenta também um alto teor em ácido oléico, quando comparado a outros óleos como o do babaçu, coco e palma. Devido ao seu perfil químico, o óleo obtido da polpa da macaúba é mais suscetível a oxidações que o extraído da amêndoa (HIANE, 2005). A Figura 6 ilustra os teores de ácidos graxos do mesocarpo e da amêndoa com suas correspondentes estruturas químicas.

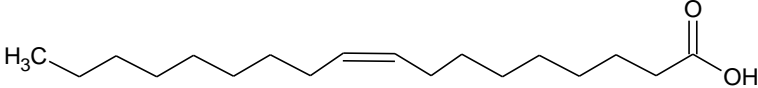
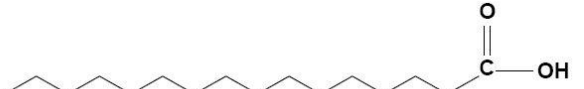

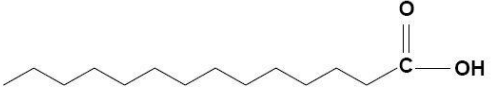
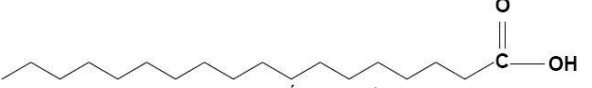
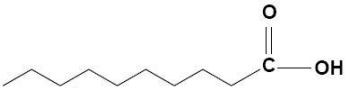
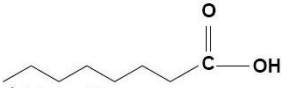
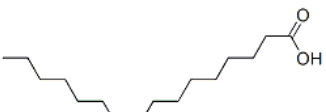
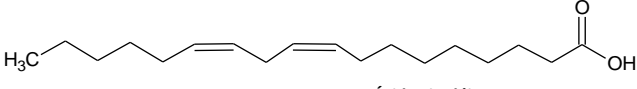
Fórmula estrutural do ácido graxo	Composição relativa aproximada
	polpa: amêndoa
 <p>ácido oleico</p>	53% : 23%
 <p>Ácido palmítico</p>	22% : 17,5%
 <p>Ácido láurico</p>	2,9% : 39%
 <p>Ácido mirístico</p>	2% : 11%
 <p>Ácido esteárico</p>	6% : 4,5%
 <p>Ácido cáprico</p>	- : 4%
 <p>Ácido caprílico</p>	- : 2%
 <p>Ácido palmitoléico</p>	5,5% : -
 <p>Ácido Linoléico</p>	5% : -

Figura 6. Composição aproximada de ácidos graxos nos óleos de mesocarpo e amêndoa da *A. aculeata* (Fonte: Fortes & Baugh, 1999 – adaptado).

Sabe-se que:

- essa espécie demonstra ter grande potencial econômico pelo seu alto teor de óleo e pode desempenhar importante papel social ao pequeno trabalhador rural (complementando a renda familiar) em virtude de sua ocorrência em áreas brasileiras de baixa expectativa econômica, principalmente no Estado do Mato Grosso do Sul;
- é importante utilizar racionalmente os recursos naturais do Cerrado, para que o desenvolvimento agrícola da região e a preservação ambiental possam coexistir de forma integrada, garantindo sustentabilidade deste ecossistema e dos sistemas de produção agrícola;
- informações a respeito das características físico-químicas, químicas, do valor nutricional e farmacológico dos frutos do cerrado são ferramentas básicas para avaliação do consumo e formulação de novos produtos;
- poucos dados estão disponíveis na literatura especializada com relação à composição química destes frutos e sua aplicação tecnológica (SILVA *et al.*, 1994; SILVA, 2001), muitos estudos foram realizados para investigar as propriedades biológicas dos óleos oriundos tanto da polpa como da amêndoa da macaúba, relacionando estrutura química e atividade biológica.

Assim, para que ocorra a incorporação desse fruto como fonte oleaginosa e alimento funcional é necessário investimento para a pesquisa e desenvolvimento desde a produção agrícola até a geração de produtos finais. Nesse trabalho relacionamos a composição química do óleo da polpa de macaúba, obtido por método de extração por solvente (com a sua caracterização), em diferentes concentrações com a atividade antidiabética e hipoglicemiante em modelo de indução de diabetes do TIPO 1 (induzido por estreptozotocina) em ratos machos *Wistar* e avaliou-se sua segurança tanto em nível de toxicidade aguda *in vivo* como em células epiteliais renais LLC-PK₁ *in vitro*.

2 - OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Caracterizar os óleos extraídos da amêndoa e da polpa de macaúba (*A. aculeata*) e avaliar o potencial toxicológico e antidiabético do óleo da polpa.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Extrair e quantificar os óleos da amêndoa e da polpa de macaúba;
- Analisar quimicamente e caracterizar os óleos de amêndoa e polpa de macaúba;
- Investigar o efeito citotóxico do óleo de polpa de macaúba por meio de ensaio de toxicidade em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*);
- Investigar o efeito citotóxico do óleo da polpa de macaúba por meio do ensaio de citotoxicidade em linhagem celular renal de porco LLC-PK₁ *in vitro*;
- Investigar a toxicidade do óleo da polpa de macaúba por meio do ensaio de toxicidade aguda *in vivo*;
- Investigar os efeitos hipoglicemiante e antidiabético de óleo da polpa de macaúba, por meio do modelo de teste de tolerância à glicose e diabetes experimental induzido por estreptozotocina, em ratos *Wistar*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do experimento

Esse estudo foi realizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), nos Laboratórios de Síntese e Caracterização Molecular (FACET); nos Laboratórios de Bioquímica, Preparo e Técnica Cirúrgica e Biotério (FCS) e também nos laboratórios de Físico-Química Biológica (IBCCF-UFRJ) e Química de Produtos Naturais (NPPN-UFRJ) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.2. Estudos fitoquímicos: Extração, Análise físico-química e química do Óleo

3.2.1. Extração do óleo de *A. aculeata*

Os óleos da polpa e da amêndoa de *A. aculeata* (Herbário da UFGD, excicata n.º. 2169) foram obtidos por extração em solvente de frutos maduros coletados na estrada Dourados-Panambizinho, na região do Alto Café, MS, nos meses de Março de 2010 e Fevereiro de 2011, segundo a metodologia descrita abaixo.

Os frutos foram lavados e descascados manualmente e a polpa escarificada. Após este procedimento, os frutos, tanto a casca quanto a polpa, foram dispostos em diferentes bandejas e secados em estufa com ventilação, com uma temperatura de 50°C durante 2 h. Após este procedimento, as amêndoas foram trituradas em moinho de facas e guardadas sob refrigeração.

O procedimento utilizado para extração do óleo da polpa e da amêndoa seguiu as recomendações de Oetterer (2006). Para tanto pesou-se 500g de amostra seca e adicionou-se, como solvente, 1 litro de Hexano. Essa mistura foi disposta em Kitassatos de 2000 mL e permaneceu sob repouso, ao abrigo de luz, por sete dias. Após este período, a mistura hexânica, foi filtrada e concentrada a 57°C em rotaevaporador.

3.2.2. Forma de armazenamento dos óleos

Durante todo o período do estudo os óleos permaneceram acondicionados em recipientes de vidro a uma temperatura de -4°C, conforme descrito por Oetterer (2006), afim

de impedir processos de degradação química, tais como fotoxidação e/ou termoxidação. De acordo com a demanda semanal, os óleos foram pesados e acondicionados em tubos tipo Falcon de 50ml devidamente identificados e armazenados em geladeira a uma temperatura de 3°C. A Figura 7 mostra o óleo extraído por solvente da polpa e da amêndoa de *A. aculeata*.



Figura 7. Óleo extraído por solvente da polpa e da amêndoa de *A. aculeata*.

3.2.3. Análise química do óleo extraído e transesterificado: determinação do índice de acidez

Para determinação do índice de acidez usou-se o óleo da polpa e amêndoa extraído por solvente, sendo que a análise foi realizada em triplicata.

Procedimento Geral: Dois gramas do óleo foram separados em três erlenmeyers aos quais se adicionou 25 mL de uma solução éter etílico e álcool etílico (2:1) e duas gotas de fenolftaleína. Em seguida os conteúdos de erlenmeyer foram titulados com uma solução padronizada de NaOH 0,1 N.

Para o cálculo do Índice de Acidez foi aplicada a seguinte fórmula:

$$Ac = V \cdot f \cdot 5,61 / P, \text{ onde:}$$

Ac: é o índice de acidez,

V: é o volume médio de NaOH utilizado para titular (mL),

f: é o fator de correção teórico,

5,61: é o equivalente-grama de KOH e,

P: o peso médio das amostras (g).

Os resultados foram expressos em mg de KOH/g de óleo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

3.2.4. Transesterificação do óleo extraído da polpa e da amêndoa de *A. aculeata*

A transesterificação dos óleos consiste no tratamento de 200 g do óleo com 60 mL de metanol e 2 g KOH, sob agitação e aquecimento (60⁰C). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada e, após consumo do óleo, a mistura reacional foi decantada por no mínimo 1 h e separada a fase glicérica (fase inferior). A fase contendo o monoéster metanólico foi então tratada com 10 mL de água destilada (2 X) e com 10 mL de cloreto de sódio 10% (1 X), secada com MgSO₄, filtrada e concentrada em rotaevaporador.

O processo de transesterificação (derivação por alquilação) do material extraído se faz necessário para análise da composição dos óleos, onde os monoésteres metílicos obtidos foram analisados por métodos espectroscópicos (FT-IR) e cromatográficos (CG/EM e CG/DIC) (RODRIGUES, 2007). O aspecto físico dos monoésteres obtidos por transesterificação dos óleos da polpa e da amêndoa de macaúba estão ilustrados na figura 8.

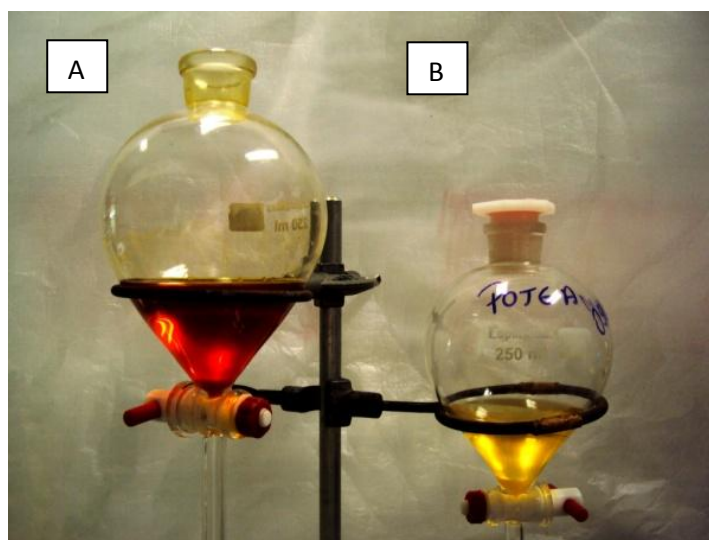


Figura 8 – Material transesterificado do óleo da polpa de macaúba (A) e do óleo da amêndoa de *A. aculeata* (B).

3.2.5. Caracterização dos ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho

Foram realizadas as análises de composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa dos monoésteres metílicos, utilizando detector de espectrometria de massas (EM) e também ionização de chama (IC). As análises de FT-IR foram conduzidas em aparelho

modelo JASCO – FT/IR- 4100 na faixa de 4000-400 cm^{-1} , a resolução foi de 4 cm^{-1} e 200 varreduras.

As condições cromatográficas, utilizando o detector espectrômetro de massas, estão resumidas na tabela 2.

Tabela 2: Condições de Análise do CG/EM

Condições	CG-EM modelo VARIAN 431-CG 210-MS
Coluna	ZB-5ms (30mx0,25mmx0,25mm df)
Gás de Arraste	HÉLIO 99,999%
Vazão do Gás de Arraste	3,0mL/min
Espectrômetro de Massas	Modo ionização de impacto de elétrons SCAN – m/z 40-700
Temperatura do Forno	50° C/1 min - 5° C/min - 248° C - 6 min
Injeção da Amostra	Modo split 50:1
Volume de Amostra	0,1 μL
Padrão	Ésteres metílicos de ácidos graxos

As condições cromatográficas, utilizando o detector de ionização de chama, estão resumidas na tabela 3.

Tabela 3: Condições de Análise do CG/DIC

Condições	CG-DIC
Coluna	ZB-Wax (5% fenildimetilpolisiloxano)
Gás de Arraste	HÉLIO 99,999%
Vazão do Gás de Arraste	3,0 mL/min
Temperatura do detector	250° C
Temperatura do Forno	50° C/1 min - 5° C/min - 248° C - 6 min
Injeção da Amostra	Modo split 50:1; Temperatura de injeção 230° C
Volume de Amostra	0,1 μL
Padrão	Ésteres metílicos de ácidos graxos

As determinações foram baseadas pela comparação dos tempos de retenção (CG) e perfil de fragmentação (EM) de padrões de ácidos graxos-metil ésteres, analisados sob as mesmas condições da amostra (COLLINS, 1997).

A quantificação foi feita pela conversão das porcentagens de áreas dos picos em relação às porcentagens de massa, empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ AG} = \frac{\text{SPAG}}{\Sigma \text{SPAG}} \times 100$$

Sendo:

SPAG = Área de cada pico de ácido graxo

ΣSPAG = Somatório de todas as áreas de picos de ácidos graxos.

3.3. Estudos farmacológicos/Ensaio biológicos

3.3.1 Animais

Foram utilizados cinquenta e quatro ratos machos *Rattus norvegicus*, distribuídos conforme tabela 4, variedade *Wistar* albinos (150-250 g), adquiridos e mantidos no Biotério Setorial da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS/UFGD).

Tabela 4: Distribuição dos animais experimentais nos ensaios de indução de diabetes, tolerância a glicose e toxicidade aguda:

Experimento	Nº de Grupos	Grupos	Nº de animais por grupo	Nº total de animais
Modelo de Indução de diabetes	4	Naive	6	24
		Controle		
		OPAA 3 mg/Kg		
		OPAA 30 mg/Kg		
Teste de Tolerância à glicose	3	Controle	6	18
		OPAA 3 mg/Kg		
		Metformina 300 mg/Kg		
Teste de Toxicidade Aguda	2	Controle	6	12
		OPAA 3 g/Kg		
			Total	54

Os animais permaneceram no biotério por um período de aclimatação de duas semanas antes do início dos estudos. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno coletivas (5-6 animais), com água *ad libitum* e ração comercial para ratos (Labina®). As condições foram controladas, a temperatura manteve-se entre 22 a 23°C e os ciclos claro-escuro foram de 12 horas. Com cerca de 2 meses de idade os animais atingiram o peso experimental (150 e 180g). Semanalmente as maravalhas foram trocadas e as gaiolas e bebedouros higienizados com água corrente e desinfetante. Nos dias em que se seguiram os experimentos para dosagem da glicemia do jejum os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e as diretrizes estabelecidas pelo Instituto Nacional dos EUA de Saúde e foi aprovado pela comissão de ética para uso de Animais da instituição (Nº 010/2011). A quantidade de animais foi a mínima necessária para mostrar efeitos consistentes dos tratamentos de drogas.

3.3.2 Drogas, Sais e Reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: Hexano P.A. (Dinamic®); Estreptozotocina (Sigma-Aldrich®); tampão de citrato de sódio 50 mM (enzyme grade; Fisher®), pH 4.5: preparados imediatamente antes da utilização; 10% de sacarose (p/p) (Sigma®): preparados imediatamente antes da utilização; Gaiolas de roedores; seringas de 3 ml; sistema de monitoramento sanguíneo para glicose One Touch Basic (Lifescan®); Solução salina 0,9% (Fresenius Kabi®); Cloridrato de metformina (Medley®); EDTA 5% (Laborclin®); Ketamina (Cristália®); Xilasina (Assedavan®); ração comercial para ratos Purina (Labina®); *Kits* colorimétricos triglicérides e colesterol total (Labtest®); células LLC-PK₁ (células epiteliais renais derivadas do túbulo proximal) obtidas da coleção de cultura celular Americana (ATCC, Manassas, VA, USA); Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Grand Island – NY, USA); Tampão salina fosfato (PBS); Iodeto de propídio (Calbiochem®, San Diego, CA); Filtro HEPA (JetBiofil®);

3.3.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: balança semi-analítica (modelo AL500 – marca Marte®), Balança semi-analítica (modelo Q-510–1500 – marca Quimis®), Bebedouros para

roedores (marca – Beiramar®), Centrífuga (modelo 80-2B – marca Centribio®), Espectrofotômetro (modelo SP-220 – marca Biospectro®), Estufa microprocessada com circulação e renovação de ar (modelo SXCR/100 – marca Sterilifer®), Gaiolas de prolipropileno (marca – Beiramar®), Rotaevaporador (modelo MA-120 – marca Marconi®), espectrofotômetro (modelo U-2001 Hitachi®).

3.3.4. Ensaios de citotoxicidade e toxicidade

3.3.4.1. Preparo da amostra

O óleo da polpa de macaúba foi diluído em álcool etílico 80% (material: fruto/solvente) na concentração de 1000 µg/mL como solução mãe. A partir dessa solução foram preparadas novas soluções diluídas em série, nas concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL. Essas soluções diluídas foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e toxicidade.

3.3.4.2. Ensaio de citotoxicidade em cultura celular

Células LLC-PK₁ (células epiteliais renais derivadas do túbulo proximal) foram mantidas em meio DMEM, com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C, com umidade do ar de 95% e 5% CO₂ e incubadas por 48 h.

Para os ensaios, as células foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços e expostas a várias concentrações de OPAA, que foram previamente dissolvidos em meio de cultura e esterilizados por filtração. As células foram incubadas com 0 µg/mL, 5 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL de OPAA por 3, 6 e 18 h. Os controles receberam somente veículo (MEKONNEN *et al.*, 2005).

3.3.4.2.1. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi medida por ensaio colorimétrico quantitativo com iodeto de propídio. Após o tratamento com OPAA, uma hora antes do final do período de incubação, 1 µL de solução de iodeto de propídio (concentração final, 1 mg/mL) foi adicionado às células, que então foram incubadas a 37°C por 1 h. As células mortas em suspensão nas placas de 24

poços e marcadas com iodeto de propídio foram contadas por meio de microscopia de fluorescência, a cada três campos por poço (MOORE *et al.*, 1998).

3.3.4.3. Ensaio de toxicidade em leveduras (Cepa W303 – *Saccharomyces cerevisiae*)

Um inóculo da cepa W303 foi adicionado a 20 mL de meio YD (2% de glicose + 1% extrato de levedura previamente autoclavado) em erlenmeyer de 250 mL, e mantido por 24 h a 30° C e agitação constante de 200 rpm.

Após crescimento da cepa, foram retirados 1 mL e colocados em 5 erlenmeyers diferentes acrescidos com 9 mL de meio YD. Foram adicionados 50 µL dos extratos do óleo da polpa diluído em álcool 80% nas concentrações de 5 µg/mL, 50 µg/mL e 500 µg/mL, nos erlenmeyers e incubados por intervalos de 3, 6, 22, 24 e 27 h. A cada intervalo de tempo determinado e inclusive no tempo 0, alíquotas de 100 µL de amostras foram adicionadas a 900 µL de água destilada para leitura em espectrofotômetro, todas as amostras foram feitas em duplicata (EVANS, 1998).

3.3.4.3.1. Determinação da viabilidade da cepa

A viabilidade da cepa W303 – *Saccharomyces cerevisiae* foi medida por metodologia empregando espectrofotômetro UV-Vis a 600 nm. Após o tratamento da cepa avaliada com o óleo e o tempo de incubação, foram realizadas as leituras no espectrofotômetro. As amostras foram diluídas em 10 vezes para a leitura. A intensidade da absorbância é diretamente proporcional a viabilidade da cepa, em relação ao padrão sem adição de OPAA. Portanto, quanto menor a absorbância, maior a mortalidade da cepa e, conseqüentemente maior a toxicidade do óleo (EVANS, 1998).

3.3.4.4. Teste de toxicidade aguda (dose única) do óleo da polpa de *A. aculeata* por via oral *in vivo*

Este ensaio foi realizado segundo protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico 423 (OECD, 2001). Inicialmente, 12 Ratos *Wistar* machos (180-240 g) foram randomicamente divididos em dois grupos de seis animais, que após 6 h de jejum foram tratados, por via oral pela técnica de gavagem:

- a) Grupo Controle – receberam somente veículo (solução salina);

b) Grupo Tratado – receberam dose única de OPAA 3 g/kg.

Os ratos só receberam alimento após 3-4 h da administração oral do óleo e veículo.

Os animais foram observados em relação aos sintomas tóxicos e mortalidade, durante os primeiros 30 min após a administração do óleo e periodicamente durante as primeiras 24 h, com atenção especial às primeiras 4 h. Após esse período de 24 h, durante 14 dias, foram avaliados sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais: anormalidades motoras, contorções abdominais, convulsões, alteração do tônus muscular), variações de peso corporal, consumo de ração e água, latência e reversibilidade da toxicidade.

Ao final de 14 dias os animais foram submetidos à eutanásia por meio de overdose de anestésicos (xilasina e cetamina). Em seguida realizou-se uma laparotomia para coleta e posterior observação macroscópica do fígado e rim.

3.3.5. Ensaios Biológicos

3.3.5.1. Modelo de indução de Diabetes Mellitus do Tipo 1 por estreptozotocina em ratos

O diabetes foi induzido por uma injeção intraperitoneal em dose única de 65 mg/Kg de estreptozotocina (STZ), diluída em tampão de citrato de sódio 0,1M (pH 4,5). O grupo de ratos Naive (não-diabético, não-induzido) recebeu apenas o volume de veículo (tampão) correspondente a cada dose. Os ratos tratados com estreptozotocina receberam 10% de glicose na sua água por 24 h após a indução do diabetes a fim de reduzir a mortalidade pelo choque hipoglicêmico deste grupo induzido. Amostras de sangue foram coletadas por punção intracaudal, sem anestesia, dos animais induzidos por estreptozotocina e dos animais Naive (não induzidos por estreptozotocina). A glicose sanguínea foi quantificada utilizando-se glicosímetro e fitas para glicemia (WU et HUAN, 2008).

Subgrupos de animais em cada grupo foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, cada qual composto por seis ratos, os quais foram denominados da seguinte maneira:

- a) Grupo Naive - não-diabético, não-induzido;
- b) Grupo CONTROLE - Diabético induzido tratado com veículo;
- c) Grupo OPAA 3 mg/Kg - Diabético induzido tratado com óleo da polpa de *A. aculeata*;
- d) Grupo OPAA 30 mg/Kg - Diabético induzido tratado com óleo da polpa de *A. aculeata*.

O grupo denominado “Naive” recebeu dieta comercial Labina®, esse grupo foi estabelecido para se obter valores de referência de níveis plasmáticos de glicose para ratos não diabéticos.

Após 14 dias de adaptação e completo estado diabético, verificado pelo nível de glicose sanguínea (após 6 h de jejum), os animais com nível sanguíneo de 250 mg/dL ou mais foram considerados como grupo diabético.

A glicose plasmática do jejum de 6 h foi determinada nos dias 21, 28, 32 e 38 após indução do estado diabético com estreptozotocina ou aplicação dos veículos. Os tratamentos foram realizados diariamente por gavagem, durante 24 dias. Diariamente o consumo de água e ração de cada grupo foram monitorados. O peso corpóreo de cada animal também foi monitorado semanalmente (SOARES *et al.*, 2000).

No 38º dia todos os animais foram eutanasiados com overdose de anestésicos (xilasina e ketamina), sendo o sangue coletado para determinação de colesterol e triglicérides.

3.3.5.1.1. Determinação de colesterol total sérico

As amostras de sangue foram colhidas após a eutanásia dos animais em jejum e foram utilizados os soros para análise. Para determinação do colesterol foi utilizado o *kit* Labtest Colesterol Liquiform.

O colesterol total foi quantificado pelo método enzimático de Trinder. Neste método, os ésteres de colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O produto do colesterol livre oxidado possui coloração vermelha e tem absorvidade máxima em 500nm no espectrofotômetro.

A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

3.3.5.1.2. Determinação de triglicérides

As amostras de sangue foram colhidas em jejum após a eutanásia dos animais e foram utilizados os soros para análise. Para determinação de triglicérides foi utilizado o *kit* Labtest triglicérides Liquiform.

Os triglicérides foram quantificados pelo método enzimático de Trinder. Neste método, a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que

oxidado forma produtos livres coloridos e tem absorvidade máxima em 500 nm no espectrofotômetro.

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos na amostra.

3.3.5.1.3. Determinação do peso dos animais

Semanalmente os animais foram pesados pela manhã, a fim de acompanhar a variação média de peso dos mesmos durante a execução do experimento.

3.3.5.1.4. Determinação do consumo de água e ração dos animais

Diariamente pela manhã, foi medido o volume de água consumido nos bebedouros de cada grupo de animais. A sobra da ração foi pesada e subtraída do peso inicial do dia anterior, a fim de acompanhar o consumo médio de água e ração dos mesmos durante a execução do experimento.

3.3.5.2. Determinação do teste de tolerância à glicose em ratos *Wistar* normoglicêmicos do óleo da polpa de *A. aculeata*

Dezoito ratos da variedade *Wistar* foram randomicamente divididos em três grupos de seis animais:

- a) Grupo Controle – receberam só veículo (solução salina 0,9% e tween 1%);
- b) Grupo tratado com OPAA 3 mg/Kg (diluído em solução salina 0,9% e tween 1%);
- c) Grupo tratado com Cloridrato de Metformina 300 mg/Kg (diluído em solução salina 0,9% e tween 1%).

O tratamento por administração oral pela técnica de gavagem foi realizado diariamente durante 5 dias.

No 5º dia, os animais foram submetidos ao jejum de 6 h antes das avaliações e acondicionados em gaiolas metabólicas, no entanto, nesse período receberam água *ad libitum*. Após o jejum de 6 h, cada animal recebeu uma dose de glicose via oral, 2 g de peso corporal / Kg (diluídos em solução salina 0,9% e tween 1%). Após 30 min dessa dose de glicose foi administrado por via oral, aos grupos: solução salina ao grupo controle, OPAA 3 mg/Kg ao

grupo tratado e 300 mg/Kg de cloridrato de metformina ao grupo controle positivo denominado.

Após 60 minutos da administração de glicose todos os animais foram imobilizados e amostras de sangue foram coletadas por venipunção caudal e níveis séricos de glicose foram medidos utilizando-se glicosímetro e fitas para glicemia (GROSS *et al.*, 1994).

3.4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm Desvio Padrão da Média (DPM). A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA seguida do teste a posteriori de *post hoc* de Tukey (GraphPad Prism 5.0 Software, San Diego, CA, U.S.A.). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudos fitoquímicos: Extração, Análise química e Caracterização dos óleos

4.1.1. Extração dos óleos de *A. aculeata*

A extração por solvente tanto do óleo da polpa de Macaúba quanto do óleo da amêndoa se deram de maneira eficiente com rendimento satisfatório e baixo índice de acidez, de modo que se obteve um material de qualidade e estável para ser transesterificado e caracterizado. O rendimento foi calculado em função da diferença de massa medida, em gramas, da polpa de Macaúba escarificada e seca antes e após o processo de extração. Já o rendimento da amêndoa foi calculado em função da diferença da massa medida, em gramas, sem endocarpo (sem secagem) antes e após extração (Tabela 5).

Tabela 5 – Rendimento, índice de acidez e rendimento de transesterificado de óleos obtidos de *A. aculeata* (macaúba).

Óleo Testado	Rendimento (%)	Índice de acidez ^a	
		Óleo	Monoéster
Polpa Seca ^b	38	5,48	1,10
Polpa Seca ^c	10	0,48	0,65
Amêndoa Seca ^b	58	1,46	0,61
Amêndoa Seca ^c	48	0,97	0,23

a= mg KOH/g Óleo; *b*= 1^a Coleta; *c*= 2^a Coleta

Sabe-se que os óleos presentes nestas oleoginosas podem sofrer inúmeros processos de degradação durante seu processamento e armazenamento, devido à presença de insaturações em sua cadeia de ácidos graxos presentes, sendo mais susceptíveis a reações de decomposição, pois estas insaturações, servem de substratos para reações de oxidação. Segundo Oetterer (2006), dentre os sítios reativos da molécula lipídica estão as duplas ligações presentes nas cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos. Essas ligações são

suscetíveis às reações de oxidação, sendo uma das mais frequentes entre lipídeos insaturados, que são provocadas, na maioria das vezes, pelo oxigênio atmosférico e, com menos frequência, por peróxidos, metais e outros agentes oxidantes. De posse desses conhecimentos prévios, algumas precauções foram tomadas quanto à preservação dos bioativos (ácidos graxos insaturados) presentes nos óleos extraídos da polpa do fruto da macaúba, e que foram utilizados neste estudo, como a conservação dos óleos a uma temperatura de -4°C e acondicionamento em frascos de vidro. Além disto, a extração do material foi realizada logo em seguida a coleta, de forma a assegurar a qualidade final do produto obtido, confirmada pelo baixo índice de acidez do óleo apresentado (tabela 5). Tais procedimentos sustentam a qualidade do material utilizado nos ensaios químicos e biológicos e asseguram reprodutibilidade dos resultados obtidos neste estudo.

4.1.2. Transesterificação do óleo extraído da polpa e da amêndoa de *A. aculeata*

A transesterificação é uma reação que converte um éster em outro, com cadeia O-alquílica diferente (RODRIGUES, 2007). Nesse caso, usamos metanol como agente de transesterificação, conforme equação da Figura 9. Determinamos o índice de acidez do produto, que, segundo demonstrado na tabela 5, os valores tanto da polpa como da amêndoa ficaram dentro do padrão RANP 07/08, para as amostras referentes à segunda coleta.

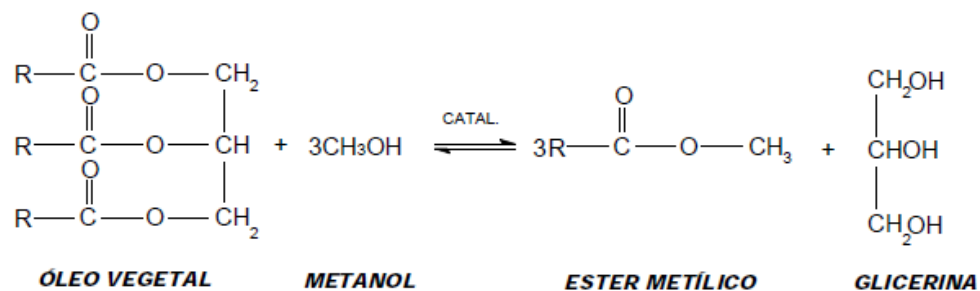


Figura 9 – Reação de transesterificação dos óleos vegetais, onde R representa as cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

4.1.3. Análise química do óleo extraído e transesterificado: determinação do índice de acidez

O índice de acidez é um indicativo da quantidade de ácidos graxos livres e da qualidade final das amostras empregadas nesse estudo e corresponde a uma das características físico-químicas mais significativas para escolha do método catalítico a ser utilizado para a etapa de transesterificação, uma vez que óleos de elevados valores em acidez produzem estruturas saponificadas em reações de transesterificação por catálise básica diminuindo os rendimentos reacionais para análise. Tanto a acidez quanto a rancificação de um óleo pode ser provocada pela presença de teores de água, enzimas ou outras substâncias catalisadoras envolvidas no processo de degradação, então é de extrema importância esta determinação para avaliar a qualidade do óleo extraído, de modo a se obter altos rendimentos na quantificação de ácidos graxos (RODRIGUES, 2007).

Foi determinado o índice de acidez do material extraído por solvente, tanto do óleo da polpa quanto da amêndoa de macaúba. Esse dado permitiu avaliar a qualidade do material, de modo a se obter um bom rendimento do produto transesterificado (dados estes apresentados na Tabela 5, expressos em mg KOH/g óleo, na coluna óleo). Os resultados demonstram que o material obtido da extração referente à 2ª coleta, apesar de apresentar um rendimento menor em relação ao material da 1ª coleta, apresentou um índice de acidez menor, sendo mais viável para o processo de transesterificação, isto pode ter ocorrido tendo em vista que a extração da 2ª coleta se deu logo em seguida ao processo de coleta, enquanto que o outro material ficou armazenado por 3 meses antes de ser extraído.

4.1.4. Composição química dos óleos e Análise de FT-IR

4.1.4.1. Análise de FT-IR

A espectrofotometria de infravermelho tem sido utilizada para identificar grupos funcionais e suas bandas correspondentes às vibrações angulares e axiais nas amostras de óleo e biodiesel.

A posição do grupo carbonila no infravermelho é sensível aos efeitos dos substituintes e à estrutura da molécula. Os ésteres têm duas bandas de absorção intensa na região da carbonila (ν C=O) em torno de 1750-1730 cm^{-1} e de C-O (deformação axial antisimétrico e alongamento axial assimétrico) em torno de 1300 – 1000 cm^{-1} .

As vibrações angulares de CH₃, CH₂ e CH aparecem à 2980-2950, 2950-2850 e 3050-3000 cm⁻¹, respectivamente, considerando as vibrações axiais (ρ CH₂) destes grupos que aparecem à 1475-1350, 1350-1150 e 722 cm⁻¹, respectivamente.

Nas análises de FT-IR, os espectros de infravermelho tanto do óleo de macaúba (polpa e amêndoa - 2^a coleta) e do seu transesterificado foram muito semelhantes, mas podemos destacar algumas diferenças importantes com o propósito de identificação (Figuras 10 e 11). O espectro dos monoésteres metílicos (tanto do material do óleo da polpa como da amêndoa da macaúba) apresentou duas bandas de absorção intensas na região da carbonila (ν C=O) em torno de 1750-1730 cm⁻¹ e de C-O em torno de 1300 – 1000 cm⁻¹. Além disso, houve um deslocamento dos picos de absorção da amostra do óleo (tanto da polpa quanto da amêndoa), que foram de 1745, 1376, 1157, 1096 e 720cm⁻¹ para 1742, 1362, 1243 e 722cm⁻¹, do material transesterificado. Nos espectros de FT-IR, os deslocamentos de picos e o desaparecimento dos picos de 1460, 1096 e 964 cm⁻¹ do espectro do óleo e o aparecimento das bandas de 1435 e 1195 cm⁻¹ no transesterificado, indicam a conversão do óleo em monoésteres metílicos (TARIQ *et al*, 2011).

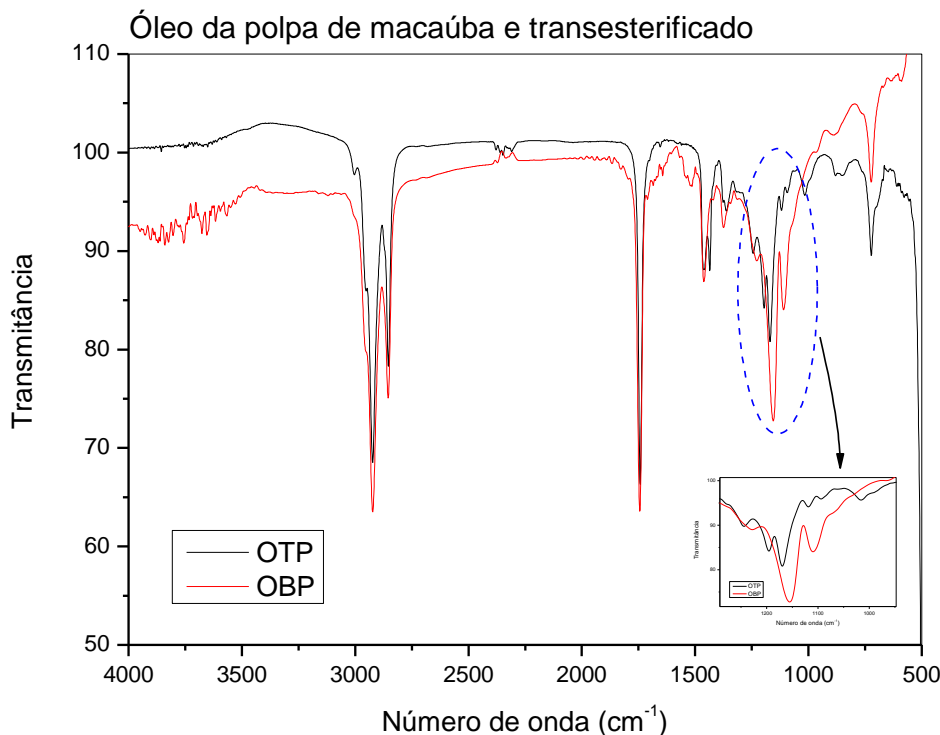


Figura 10. Espectro de infravermelho do óleo bruto da polpa de *A. aculeata* - 2^a coleta (-OBP) e do material transesterificado (-OTP).

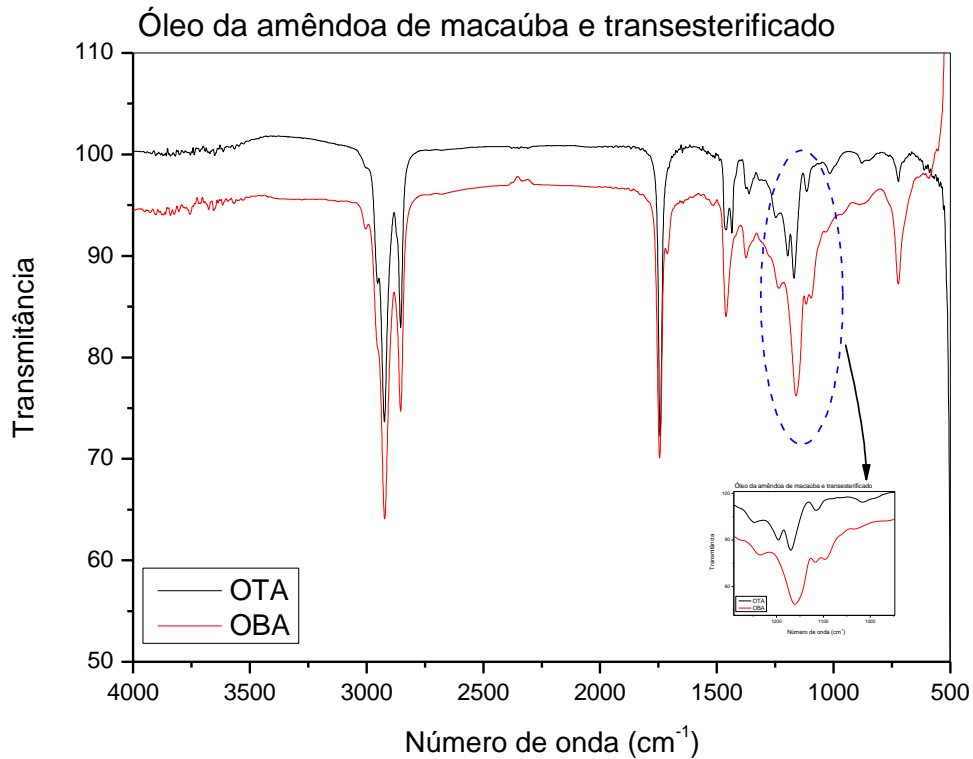


Figura 11. Espectro de infravermelho do óleo bruto da amêndoa de *A. aculeata* - 2^a coleta (-OBA) e do material transesterificado (-OTA).

4.1.4.2. Análise de CG/EM

Nas análises quantitativas dos ésteres metílicos optou-se pelo método de cromatografia gasosa, onde compara-se os picos (nos cromatogramas) dos produtos obtidos com os dos padrões dos respectivos ácidos graxos. Os dados de percentual de área obtido do pico, do material extraído da polpa de *A. aculeata* da 1^a coleta e 2^a coleta estão representados na Tabela 6, cujas análises foram feitas em duplicata.

Os resultados demonstraram que não houve modificação significativa na composição dos ácidos graxos majoritários em ambas as coletas do material da polpa (sombreado na tabela), podendo-se destacar a alta concentração dos ácidos graxos de cadeia saturada, palmítico (C16) em torno de 30%, e do ácido graxo insaturado, oléico (C18:1) em torno de 62%.

Já com relação aos constituintes de menor concentração, pode-se destacar o ácido graxo linoléico no qual se obteve um grande aumento na concentração na 2^a coleta (em negrito na tabela). Além disso, na 1^a coleta não foi observada a presença dos ácidos graxos

caprílico e cáprico, mas sim do ácido graxo araquídico que não havia sido identificado na 1ª coleta.

Tabela 6 – Composição dos ácidos graxos da polpa de *A. aculeata* (macaúba), obtida na 1ª coleta e na 2ª coleta, por CG/EM.

Ácido Graxo (metil éster)	%Área do pico (CG) +/- erro padrão	
	Polpa (1ª coleta)	Polpa (2ª coleta)
Caprílico (C8:0)	0,096 ± 0,062	-
Cáprico (C10:0)	0,103 ± 0,069	-
Láurico (C12:0)	0,567 ± 0,377	0,184 ± 0,019
Mirístico (C14:0)	0,335 ± 0,827	0,243 ± 0,086
Palmitoléico (C16:1)	2,796 ± 0,183	2,016 ± 0,203
Palmítico (C16:0)	30,788 ± 1,878	28,626 ± 4,352
Linoléico (C18:2)	0,472 ± 0,088	2,605 ± 0,341
Oléico (C18:1)	61,736 ± 2,190	61,092 ± 2,731
Esteárico (C18:0)	2,312 ± 0,210	2,978 ± 0,631
Araquídico (C20)	-	1,087 ± 0,194

Os cromatogramas do óleo da polpa, para obtenção dos valores da tabela, estão representados a seguir nas Figuras 12 e 13.

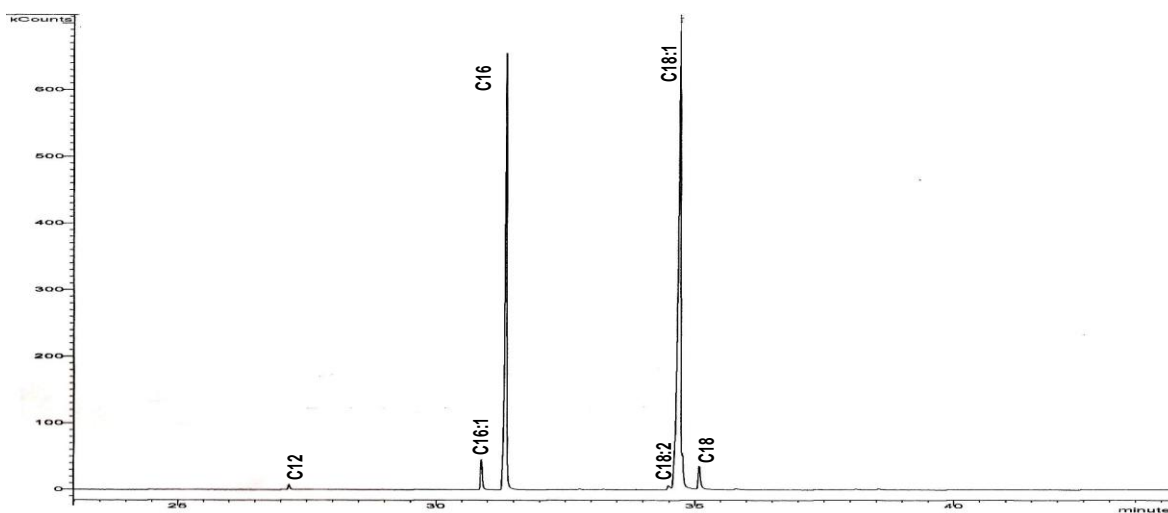


Figura 12 – Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da polpa de *A. aculeata* (macaúba), 1ª coleta.

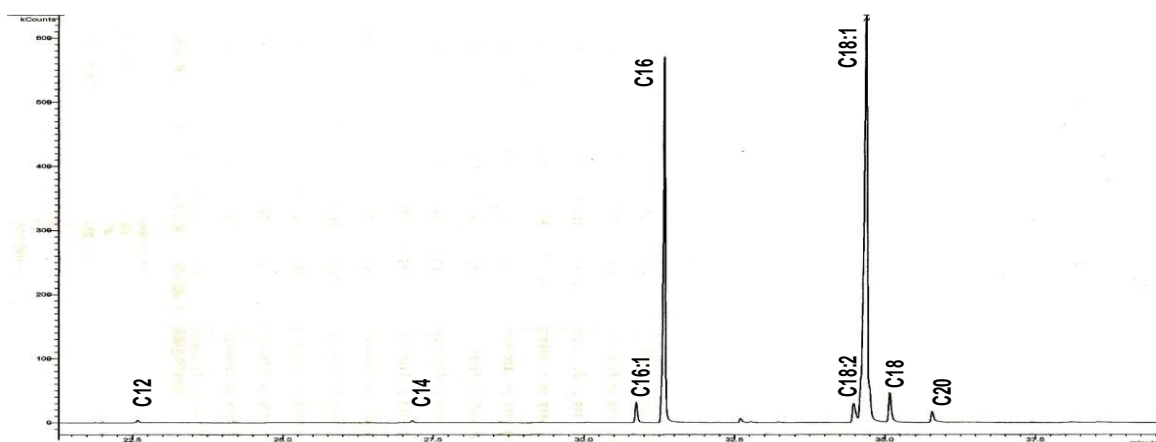


Figura 13 – Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da polpa de *A. aculeata* (macaúba), 2^a coleta.

A mesma análise foi realizada para o óleo da amêndoa de *A. aculeata* (macaúba) e os dados estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição dos ácidos graxos da amêndoa de *A. aculeata* (macaúba), obtida na 1^a coleta e na 2^a coleta, por CG/EM.

Ácido Graxo (metil éster)	%Área do pico (CG) +/- erro padrão	
	Amêndoa (1 ^a coleta)	Amêndoa (2 ^a coleta)
Caprílico (C8:0)	1,463 ± 0,058	1,864 ± 0,117
Cáprico (C10:0)	1,974 ± 0,016	2,766 ± 0,107
Láurico (C12:0)	65,646 ± 0,413	33,562 ± 1,985
Mirístico (C14:0)	10,876 ± 0,132	9,958 ± 0,323
Palmítico (C16:0)	4,498 ± 0,165	8,058 ± 0,181
Linoléico (C18:2)	1,833 ± 0,225	2,965 ± 0,102
Oléico (C18:1)	10,862 ± 0,006	33,210 ± 1,879
Estearíco (C18:0)	2,424 ± 0,138	4,962 ± 0,228

Os resultados demonstraram que em relação às duas coletas, o óleo obtido da amêndoa, apresentou grande diferença na concentração dos ácidos graxos majoritários (sombreado na tabela), como o ácido graxo saturado láurico (C12), que ocorre em maior concentração tanto na 1^a coleta como na 2^a coleta. Porém, observa-se um grande decréscimo da concentração desse óleo nas amostras da 2^a coleta em cerca de 50% (de 65% para 33%).

Em relação aos ácidos graxos saturados, palmítico (C16) e esteárico (C18), houve um aumento de 50% nas concentrações dos mesmos, de 4% na 1ª coleta vai para 8% na 2ª coleta e de 2,5% na 1ª coleta para 5%, respectivamente. O mesmo pode-se observar com o ácido graxo insaturado oléico (C18:1), cuja concentração que é de 11% na 1ª coleta vai para 33% na 2ª coleta (aumento de três vezes). Isto pode ter se dado pela diferença entre as coletas ou pelo fato de que o material referente a 2ª coleta foi extraído por Soxhlet.

Os cromatogramas de análise da amêndoa, para obtenção dos valores da tabela, seguem respectivamente:

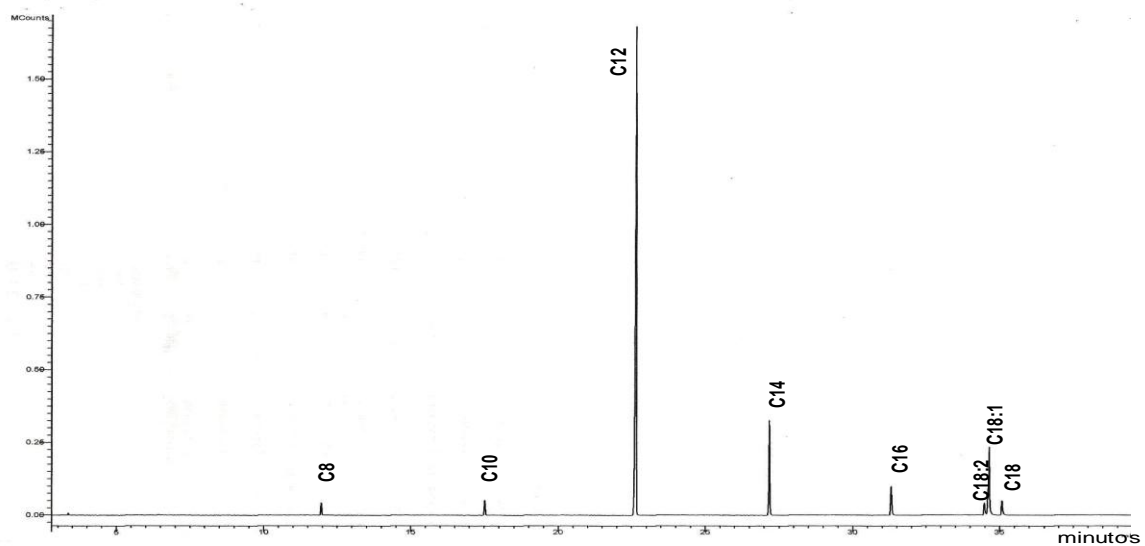


Figura 14 – Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da amêndoa de *A. aculeata* (macaúba), 1ª coleta.

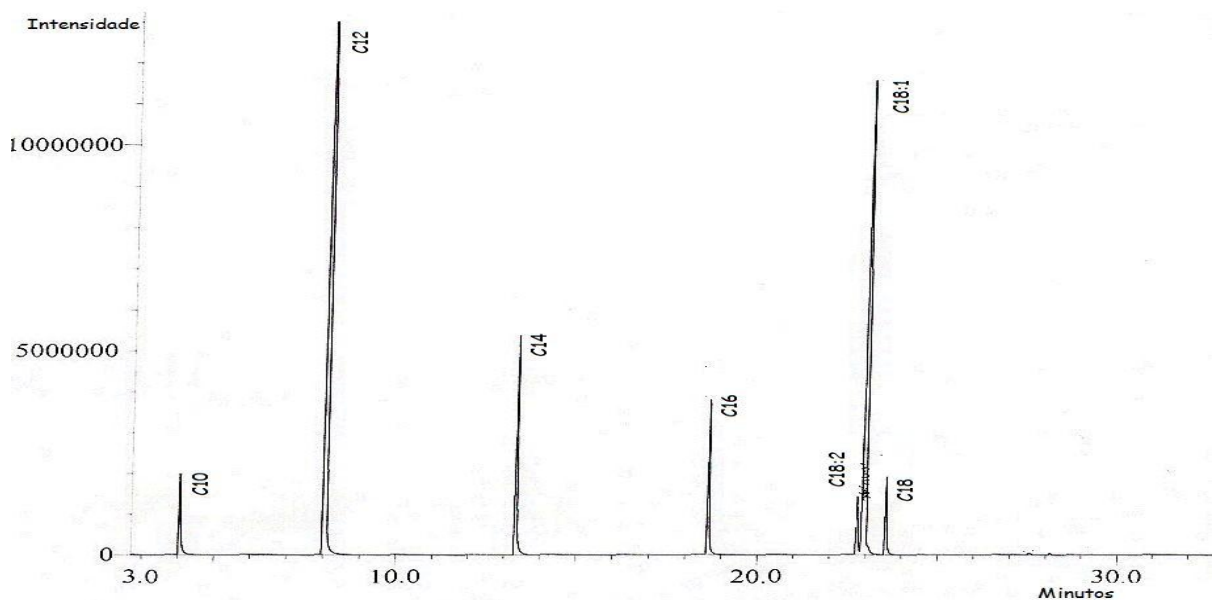


Figura 15 – Cromatograma obtido por CG/EM do óleo da amêndoa de *A. aculeata* (macaúba), 2ª coleta.

4.1.4.3. Análise CG/DIC

Esta análise só foi realizada com a amostra do óleo da polpa de *A. aculeata*, referente à 2ª coleta, tendo em vista que, para o estudo biológico, o mesmo apresentou melhor resposta para o efeito antidiabético.

Essa análise foi necessária para completa atribuição dos dados obtidos na análise de CG/EM, já que a coluna utilizada nesta análise apresenta uma fase estacionária e tamanho maior que permite uma melhor resolução. Os dados de percentual de área obtido dos picos correspondentes ao material extraído da polpa de *A. aculeata* estão representados na Tabela 8, sendo efetuada somente uma análise, já que se confirmaram os valores e respectivas cadeias de ácidos graxos obtidos no CG/EM, com exceção dos picos principais não sobrepostos assim como a presença do ácido graxo insaturado, linolênico (C18:3) que não havia sido identificado na análise anterior. Os ácidos graxos majoritários estão destacados na tabela em sombreado.

Tabela 8 – Composição dos ácidos graxos da polpa de *A. aculeata* (macaúba), obtida na 2ª coleta, por CG/DIC.

Ácido Graxo (metil éster)	%Área do pico (CG/DIC)
	Polpa (2ª coleta)
Laúrico (C12:0)	0,250
Mirístico (C14:0)	0,070
Palmitoléico (C16:1)	2,031
Palmítico (C16:0)	20,587
Esteárico (C18:0)	2,614
Oléico (C18:1)	71,305
Linoléico (C18:2)	2,050
Linolênico (C18:3)	0,311
Araquídico (C20)	0,154

Os resultados demonstraram nesta análise cromatográfica a presença de ácido graxo insaturado linolênico (C18:3) e o deslocamento do pico do ácido graxo saturado, esteárico (C18), e a não sobreposição do pico de ácido graxo insaturado, oléico (C18:1), como mostra o cromatograma na Figura 16.

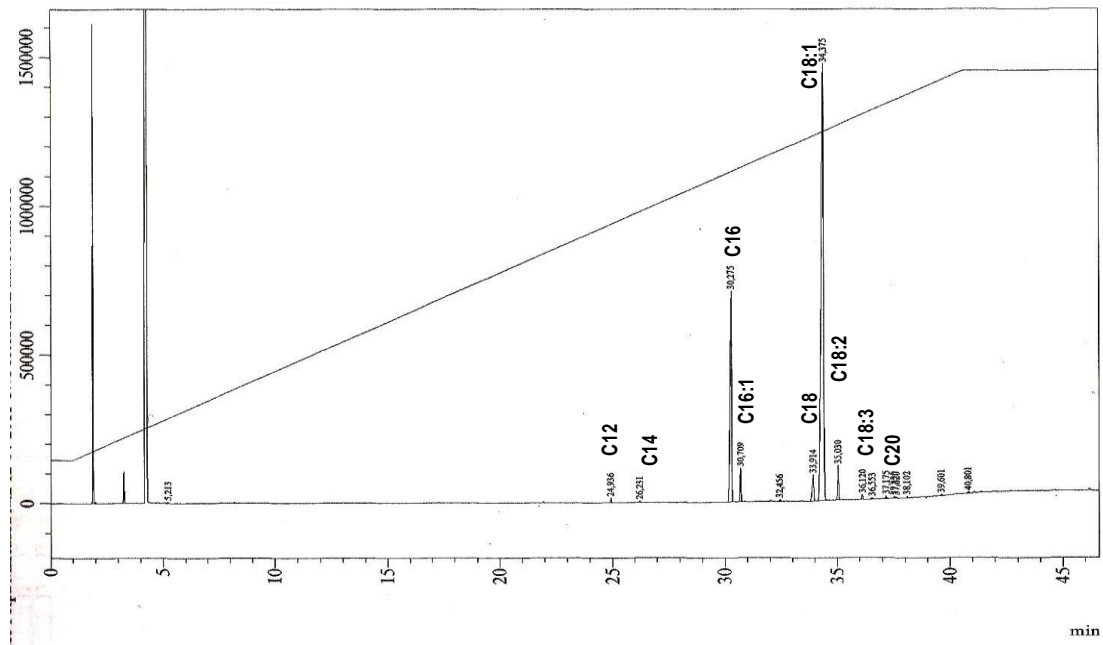


Figura 16 – Cromatograma obtido por CG/DIC do óleo da polpa de *A. aculeata* (macaúba), 2ª coleta.

Os dados foram confirmados pela análise do padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (SUPELCO®) que foi realizada no mesmo dia e seguindo os mesmos parâmetros da amostra. Verificou-se que os resultados da análise de CG/DIC são semelhantes aos obtidos pelo CG/EM, em termos de componentes identificados e suas concentrações no óleo da polpa de macaúba (2ª coleta).

Segundo Hiane *et al.* (2005) o óleo da polpa de macaúba apresenta teores de ácido oléico superiores ao do azeite de oliva. Tais teores são da ordem de 62,2% a 65,9% do total de ácidos graxos. Esse relato são corroborados pelos resultados de caracterização química encontrados na presente pesquisa, onde a predominância desse ácido graxo monoinsaturado é identificado pelos estudos de CG/EM e CG/DIC (Tabela 6 e 8).

De uma forma geral, em se tratando da composição em ácidos graxos, Hiane *et al.* (2005) verificaram diferenças nos óleos da polpa e da amêndoa de *A. aculeata*. Relata-se que a quantidade de ácidos graxos saturados do óleo da polpa é menor (25,52%) que a do óleo da amêndoa (46,69%).

Nos experimentos de extração de ambos os óleos pode-se observar diferenças quanto a rentabilidade (Tabela 5), a composição e quantidade de ácidos graxos saturados dos óleos referenciados neste estudo (Tabelas 6 e 7).

Segundo Reis *et al.* (2009), os ácidos graxos insaturados encontram-se principalmente nos óleos vegetais, especialmente nos óleos de amendoim, soja, milho, algodão, girassol e linhaça. Além disso, afirmam que a quantidade de óleo presente no mesocarpo de *A. aculeata* ultrapassa a de muitas oleaginosas, tais como pinhão manso, soja, amendoim, e girassol. Estes relatos corroboram o estudo de caracterização realizado e confirma a grande concentração de ácido graxo insaturado (ácido oléico) presente no OPAA (Tabelas 6 e 8).

4.2. Estudos farmacológicos/Ensaio biológicos

4.2.1. Ensaio de citotoxicidade em cultura celular

A Figura 17 demonstra, pelo ensaio de citotoxicidade *in vitro* com células LLC-PK₁, que o OPAA não diminui a viabilidade das células epiteliais renais mesmo na concentração de 500 µg/mL (maior concentração testada) e no maior tempo de incubação (18 h) em comparação com o controle. Logo, nenhuma citotoxicidade significativa foi observada, o que sugere segurança para os ensaios *in vivo*.

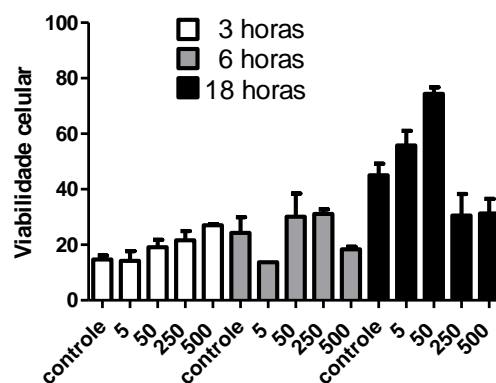


Figura 17. Viabilidade das células LLC-PK₁ em cultura (em número de células mortas) medida pela exclusão do iodeto de propídio após incubação de 3, 6 e 18 h com diferentes concentrações de OPAA 5, 50, 250 e 500 µg/mL. Cada barra representa a média com n = 2 e as linhas verticais mostram o DP (* $p < 0,05$).

Há uma boa correlação entre citotoxicidade e número de células mortas marcadas com iodeto de propídio, já que agentes tóxicos podem alterar a superfície celular ou a membrana lisossomal que tornam o processo de viabilidade irreversível, resultando na morte celular e/ou

na inibição do crescimento celular (ROESLER, 2010). O OPAA não diminui a viabilidade celular comparado ao controle (sem o agente toxicológico), mesmo na maior concentração de 500 µg/mL e no maior tempo de incubação. Portanto, os resultados não evidenciam nenhuma toxicidade para o óleo da polpa de macaúba nas células LLC-PK₁.

4.2.2. Testes de toxicidade em leveduras (Cepa W303 – *Saccharomyces cerevisiae*)

Segundo Evans (1998), a membrana de leveduras geralmente não apresenta ácidos graxos poliinsaturados, sendo a bicamada de fosfolipídeos composta de ácido graxo monoinsaturado (ácido graxo palmitoleico). No entanto, ácidos graxos poliinsaturados (tal como o ácido linoleico) no meio são incorporados na membrana de levedura. A peroxidação lipídica pode ser iniciada com qualquer ácido graxo insaturado, incluindo os monoinsaturados oleico e palmitoleico, resultando em produtos que são semelhantes às que ocorrem na presença de ácidos graxos poliinsaturados. Por essas razões, foi necessário determinar o efeito de um intermediário da peroxidação lipídica, como o LoaOOH (ácido linoleico hidroperóxido), presente na composição do OPAA, em *S. cerevisiae*, uma vez que estão expostos a levedura em seu ambiente natural. O ácido graxo linoleico radicalar apresenta toxicidade frente à biomembrana de leveduras sendo capaz de danificá-la, mesmo em pequenas concentrações (0,2 mM).

A fim de se determinar a cinética de perda da viabilidade celular, a cepa de *Saccharomyces cerevisiae* foi tratada com diferentes concentrações do OPAA (possível agente toxicológico) na sua presença e ausência (controle). No experimento de toxicidade em Leveduras (Figura 18), pode-se observar que não houve nenhuma alteração significativa no crescimento celular da cepa na presença do possível agente toxicológico OPAA em todas as concentrações testadas (5 µg/mL, 50 µg/mL e 500 µg/mL), em comparação com o controle (cepa sem agente toxicológico) durante as 27 horas de incubação, de modo que o óleo testado da polpa de macaúba, mesmo em pequenas concentrações não se mostrou tóxico para a levedura.

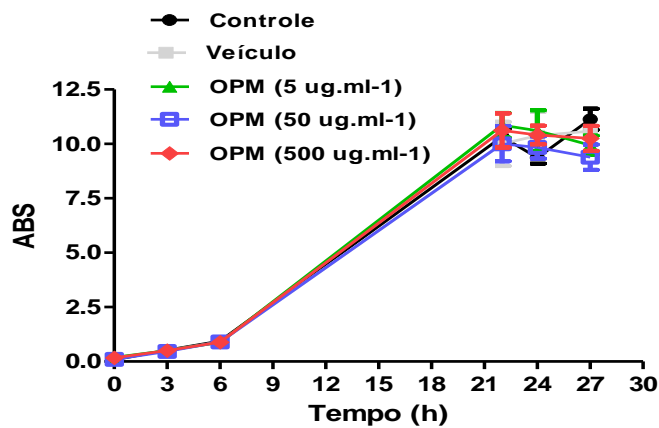


Figura 18 - Gráfico de Absorbância (ABS) x Tempo, referente ao crescimento de *S. cerevisiae* frente às diferentes concentrações de OPAA em relação ao controle e veículo em diferentes tempos de incubação (3, 6, 22, 24 e 27 h).

4.2.3. Teste de Toxicidade aguda (dose única) do óleo da polpa de *A. aculeata* por via oral *in vivo*

Nenhuma morte ou sinais de toxicidade foram registrados nos animais experimentais durante as 24 h que se seguiram a administração oral do OPAA (na concentração de 3 g/Kg em dose única). Durante os 14 dias de observação. Também foi observado que não houve nenhuma alteração no consumo diário de água e ração do grupo tratado em relação ao controle, assim como no peso corpóreo.

Na avaliação macroscópica dos órgãos fígado e rim dos animais tratados não foram observadas alterações relevantes relativas ao peso absoluto e relativo, cor e textura, quando comparados ao grupo controle.

Por meio do experimento de toxicidade aguda *in vivo*, pode-se sugerir a segurança para a administração oral de OPAA na dose única de 3 g/Kg, tendo em vista que mesmo após 24 h de sua administração não houve qualquer mortalidade entre os ratos deste grupo, como sinais clínicos de toxicidade, ou alterações grosseiras perceptíveis atribuíveis à toxicidade hepática ou qualquer dano de outros órgãos.

Os resultados dos testes de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade aguda *in vivo* sugerem que o OPAA é seguro para ser testado em modelos de atividade, uma vez que não demonstrou nenhuma toxicidade em ratos e nas células epiteliais renais nessas condições testadas.

4.2.4. Modelo de indução de Diabetes *Mellitus* do Tipo 1 por estreptozotocina em ratos

Os resultados descritos na Figura 19 demonstram que o tratamento diário por via oral de OPAA na dose de 3 mg/Kg induziu significativamente a redução dos níveis de glicose plasmática em ratos, em apenas 7 dias de tratamento (21 dias após indução com estreptozotocina) quando comparados com grupo controle (diabético induzido tratado com veículo). A mesma figura também demonstra que o tratamento diário por via oral com OPAA na dose de 30 mg/kg não foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de glicose, ficando próximos a níveis plasmáticos do grupo CONTROLE.

O tratamento contínuo de ratos diabéticos com OPAA na dose de 3 mg/kg reduziu a glicose plasmática ao nível do grupo NAIVE, dentro de uma semana e esse decréscimo se deu continuamente durante os 24 dias de tratamento.

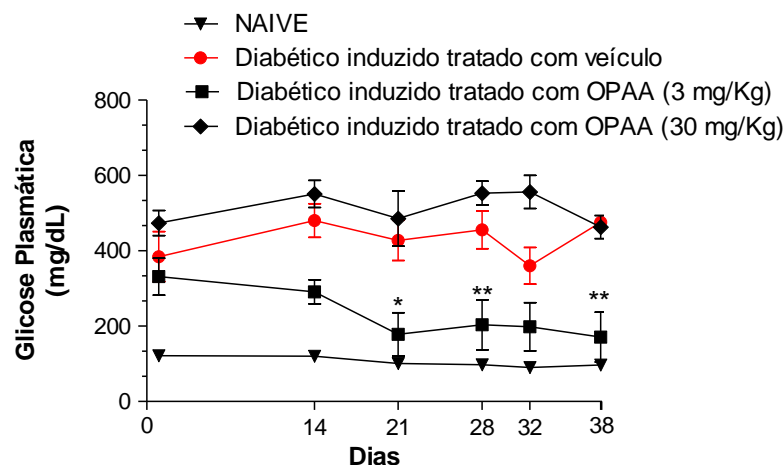


Figura 19. Efeitos do tratamento oral com OPAA sobre o aumento dos níveis de glicose no diabetes *Mellitus* do Tipo 1 induzido por estreptozotocina nos diferentes grupos de ratos, nas doses de 3 mg/kg, e 30 mg/kg, comparados aos grupos diabético tratado com veículo (CONTROLE) durante 24 dias e não-diabético não-tratado (NAIVE). Os dados foram representados pela média e as linhas verticais demonstram o \pm DP (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$).

Naturalmente os óleos, cuja cadeia de ácidos graxos é monoinsaturada (ácido oleico) geralmente apresentam atividade antioxidante, que é relevante no tratamento do diabetes, pois as complicações do diabetes estão relacionadas em parte a danos oriundos de radicais livres e essa oxidação é catalisada por metais de transição (REAVEN, 1995).

A hiperglicemia pode levar ao estresse oxidativo e a modificações lipídicas e protéicas (HUNT et al., 1990). Assim, dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados pode inibir a

glicosilação de proteínas e reduzir os produtos finais de glicosilação avançados (PGA), que são radicais livres (REAVEN, 1995). Esses efeitos sobre a hiperglicemia podem ser a chave para o controle do nível de glicose, tendo efeitos benéficos contra a diabetes. Tais características dos óleos têm atraído nosso interesse para explorar as atividades hipoglicemiante e antidiabética da OPAA, tendo em vista que a polpa desse fruto é rica em ácido oléico.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade aguda *in vivo* demonstraram a segurança de uso do óleo da polpa da macaúba, ensaios esses nunca antes realizados e dados toxicológicos inéditos para este óleo.

Em relação aos resultados obtidos no modelo de indução do diabetes do Tipo 1 com estreptozotocina, o tratamento oral dos animais com o óleo da polpa de *A. aculeata*, demonstrou que esse óleo apresenta compostos bioativos, confirmados pelos estudos de caracterização química, com importante influência no controle de diabetes. Os resultados obtidos pelo tratamento realizado com os animais, por meio da administração de duas diferentes doses do óleo extraído por solvente da polpa de macaúba, demonstraram que a dose de 3 mg/Kg, é eficiente na redução dos níveis plasmáticos de glicose de ratos diabéticos. Já a dose de 30 mg/Kg não demonstrou o mesmo efeito. Baseado em estudo prévio de Berry e Pérez (1997) pode-se sugerir que o mecanismo de redução relaciona-se aos efeitos antioxidantes e hipoglicêmicos dos ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico).

Os dados do presente estudo confirmam as atividades antidiabética e hipoglicemiante do OPAA (Figura 19) no modelo sugerido de indução de diabetes, demonstrando uma atividade só antes verificada para extratos de outra parte da planta, a raiz.

4.2.4.1. Determinação de colesterol total sérico

Os exames laboratoriais para dosagem de colesterol sérico foram realizados no 38º dia, após eutanásia dos animais e constatou-se redução significativa do colesterol nos animais diabéticos induzidos e tratados com OPAA na dose de 30 mg/Kg, em relação ao grupo diabético induzido e tratado com veículo (CONTROLE) (Figura 20).

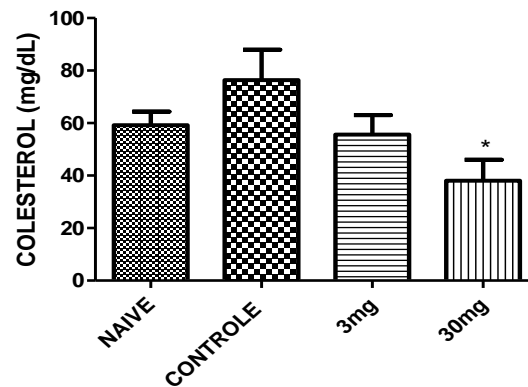


Figura 20. Níveis plasmáticos de colesterol total em ratos *Wistar* no 38º dia do experimento, nos grupos de ratos Naive, Diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE), Diabético tratado com OPAA nas doses de 3 mg/Kg e 30 mg/Kg. As barras representam as médias \pm DP da concentração de colesterol total (* $p < 0,05$).

O mesmo não foi observado em relação ao grupo de animais diabéticos induzidos e tratados com OPAA na dose de 3 mg/Kg, o que sugere um efeito hipocolesterêmico dose dependente do óleo. Isto pode ser explicado pelo fato do ácido graxo monoinsaturado, presente em maior concentração, ter como função o aumento da quantidade de receptores de LDL, e por sua ação antioxidante, que evita a oxidação da lipoproteína LDL, o que resulta na redução do colesterol (HARGROVE, 2001).

Estudos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa (RAMIRO, 2010) demonstraram que o OPAA possui compostos bioativos (provavelmente oriundos dos ácidos graxos poliinsaturados como o linoléico e linolênico e o ácido graxo monoinsaturado oléico) capazes de impedir o desenvolvimento de alterações nos níveis séricos de colesterol total de ratos, mesmo quando estes foram expostos ao fator de risco (dieta rica em frutose e gordura animal), com quadro de dislipidemia bem estabelecida.

Contudo, no diabetes do tipo 1 não seria esperado, pelo tempo de indução e pela dieta normal (ração) consumida pelos animais, que houvesse um aumento dos níveis de colesterol ou triglicérides. Tal fato foi confirmado pelos níveis normais dos indivíduos no grupo de ratos diabéticos tratados com veículo (CONTROLE).

Porém, sabe-se que na alimentação normal, a substituição de ácidos graxos saturados por ácidos graxos monoinsaturados diminui os níveis séricos de colesterol total, de LDL colesterol e de triglicérides tanto quanto com o uso de ácidos graxos poliinsaturados (CIPRIANO, 2006), de modo que os níveis de colesterol total no soro diminuídos pelo

tratamento oral com óleo da polpa de macaúba na concentração mais alta (30 mg/Kg) eram esperados.

No estudo conduzido por Moundras *et al.* (1993) o nível de colesterol plasmático encontrado em ratos normais foi de 64,1 mg/dL. Na pesquisa de Viejo *et al.* (2003) o parâmetro de normalidade de colesterol total definido para ratos foi de 67,2 mg/dL. Tais valores se aproximam aos valores apresentados no presente trabalho para os grupos de ratos não-diabéticos, não-tratados (Naive) e os diabéticos induzidos tratados com OPAA 3 mg/Kg. No estudo conduzido por Nagaraju & Lokesh (2007) foi avaliada a influência de dietas ricas em ácidos graxos saturados e insaturados nos níveis séricos de colesterol total em ratos *Wistar* machos recém-desmamados. Os diferentes grupos de animais foram alimentados durante 60 dias com dieta padrão, dieta com mistura simples de óleo de coco + óleo de amendoim; dieta com mistura simples de óleo de coco + azeite de oliva; dieta com óleo de coco + óleo de amendoim interesterificados e por fim dieta com óleo de coco + azeite de oliva interesterificados. Os níveis séricos de colesterol apresentaram-se reduzidos em 6% e 13% nos animais que receberam dietas com misturas simples de óleo de coco + óleo amendoim e dietas contendo misturas simples de óleo de coco + azeite de oliva, respectivamente. Quando comparados ao grupo controle, que recebeu dieta contendo somente óleo de coco; os animais alimentados com óleo de coco + óleo de amendoim interesterificados e o grupo alimentado com óleo de coco + azeite de oliva interesterificados apresentaram diminuição de 21% e 32% dos níveis de colesterol total respectivamente. Esse estudo demonstrou que blendas de óleos possuem um efeito hipocolesterolêmico em ratos, sendo um efeito maior observado nas blendas que continham azeite de oliva.

Nesse presente trabalho, os grupos que foram tratados durante 24 dias na maior dose de OPAA (30 mg/Kg) apresentaram redução do colesterol sérico na mesma proporção que no estudo de Nagaraju & Lokesh ($\pm 25\%$) e em conformidade aos resultados obtidos por Ramiro (2010). Tal efeito pode ser atribuído à presença do ácido graxo oléico nas amostras de *A. aculeata* utilizadas nesse estudo.

Tem-se desta maneira dois efeitos do OPAA observados, ou seja, na dose de 3 mg/Kg um efeito hipoglicemiante e antidiabético e na dose de 30 mg/Kg um efeito hipocolesterêmico dose dependente.

4.2.4.2. Determinação de triglicérides

Em relação à avaliação laboratorial dos triglicerídeos plasmáticos não houve diferença estatística significativa entre os grupos Naive, diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE) e os diabéticos induzidos tratados com 3 mg/Kg e 30 mg/Kg (figura 21).

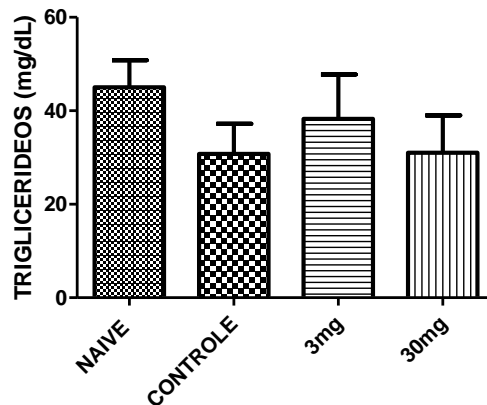


Figura 21. Níveis plasmáticos de triglicerídeos em ratos *Wistar* no 38º dia do experimento, nos grupos de ratos Naive, Diabético induzido tratado com veículo (CONTROLE), Diabético tratado com OPAA nas doses de 3 mg/Kg e 30 mg/Kg. As barras representam as médias \pm DP da concentração de colesterol total .

As concentrações plasmáticas de triglicerídeos do grupo Naive encontradas nesse estudo, foram um pouco abaixo da média dos parâmetros de normalidade encontrados na literatura. Sousa *et al.* (2002) observaram níveis de triglicerídeo da ordem de 84,9 mg/dL no grupo controle, enquanto que Curti (2003) observou valores de 70,38 mg/dL de triglicerídeos para ratos normais. Nesse estudo observamos que, tanto no grupo Naive, quanto nos grupos diabéticos controle e grupos diabéticos tratados com OPAA 3 e 30 mg/Kg, os resultados não evidenciaram nenhuma alteração significativa nos níveis de triglicérides (Figura 21).

4.2.4.3. Determinação do peso dos animais

Segundo Mahan *et al.* (2002), o peso corporal total é determinado pela soma dos ossos, músculos, órgãos, fluidos corpóreos e os tecidos adiposos, onde a principal alteração no peso corpóreo é ocasionada pela variação do tamanho do depósito de gordura corporal, normalmente ocasionado pela ingestão alimentar.

Não foram detectadas nenhuma diferença significativa quanto ao peso corpóreo entre os grupos normoglicêmicos, controle diabético com veículo, diabéticos tratados com 3 mg/Kg e 30 mg/Kg (tabela 9).

Tabela 9 – Peso corporal (g) de ratos **NAIVE** (não diabético, não induzido), diabético induzido tratado com veículo (**CONTROLE**), diabético induzido tratado com OPAA na dose de 3 mg/Kg (**OPAA 3 mg/Kg**) e diabético induzido tratado com OPAA na dose de 30 mg/Kg (**OPAA 30 mg/Kg**) durante os 38 dias do experimento.

GRUPOS	DIAS					
	1	14	21	28	32	38
NAIVE	162,4 ± 5,18	226,0 ± 29,69	269,4 ± 7,54	285,0 ± 11	301,0 ± 11,96	302,0 ± 11,89
CONTROLE	176,4 ± 7,89	217,6 ± 27,5	202,0 ± 31,7	234,6 ± 46,62	233,0 ± 50,95	244,2 ± 49,54
OPAA 3 mg/Kg	157,2 ± 2,86	191,2 ± 13,5	206,4 ± 16,88	222,0 ± 19,64	226,8 ± 25,87	251,6 ± 21,5
OPAA 30 mg/Kg	155,2 ± 15,86	195,0 ± 13,92	214,0 ± 31,1	235,6 ± 23,06	229,8 ± 36,34	242,0 ± 33,75

Dados representados pela Média ± Desvio padrão de seis animais por tratamento, avaliados em função de $p < 0,05$.

4.2.4.4. Determinação do consumo de água e ração dos animais

Em relação ao consumo diário de ração não foi observada nenhuma diferença estatística significativa. Porém, em relação ao consumo de água pode-se observar que o grupo diabético induzido e tratado com OPAA na dose de 3 mg/Kg apresentou o mesmo consumo que o grupo de ratos Naive, durante o tratamento, sugerindo desta forma uma normalização dos sinais clínicos, do diabetes do Tipo 1, de polidipsia. O mesmo não foi observado quanto ao consumo de água para o grupo de ratos diabéticos induzidos e tratados com óleo de polpa de macaúba 30 mg/Kg (Tabela 10).

Tabela 10 – Consumo diário de líquido (mL) e de ração de ratos **NAIVE** (não-diabético, não-induzido), diabético induzido tratado com veículo (**CONTROLE**), diabético induzido tratado com OPAA na dose de 3 mg/Kg (**OPAA 3 mg/Kg**) e diabético induzido tratado com OPAA na dose de 30 mg/Kg (**OPAA 30 mg/Kg**) durante os 38 dias do experimento.

PARÂMETROS	GRUPOS			
	NAIVE	CONTROLE	OPAA 3 mg/Kg	OPAA 30 mg/Kg
Consumo de Água (mL)	56,89 ± 7,21	83,11 ± 4,67	54,36 ± 8,14	84,90 ± 5,01
Consumo de Ração (g)	28,25 ± 5,68	32,00 ± 8,48	29,50 ± 7,42	29,25 ± 2,50

Dados representados pela Média ± Desvio padrão de seis animais por tratamento, avaliados em função de $p < 0,05$.

4.2.5. Determinação do teste de tolerância à glicose em ratos *Wistar* normoglicêmicos do óleo da polpa de *A. aculeata*

Entre os principais efeitos dos ácidos graxos monoinsaturados, pertencentes à série ômega-9 (ω -9), cujo precursor é o ácido oléico, incluem-se diminuição do colesterol total e do LDL - colesterol, antitrombótico, inibição da agregação plaquetária. Além disso possui ações antioxidantes e protetoras, melhora a resistência à insulina e conseqüentemente diminui o nível de glicose plasmática do diabético (CUKIER, 2005).

O mecanismo de melhora a resistência à insulina foi confirmado neste estudo pelo teste de tolerância à glicose, onde os ratos normoglicêmicos tratados com OPAA 3 mg/Kg após sobrecarga de glicose também apresentam uma redução dos níveis de glicose plasmática (levando a um efeito hipoglicêmico) (Figura 22). O efeito hipoglicemiante detectado pode ser comparado ao grupo tratado com cloridrato de metformina 300 mg/Kg (que atua por aumentar a sensibilidade do fígado, músculo, gordura, e outros tecidos na captação de insulina e conseqüentes efeitos que reduzem os níveis de açúcar no sangue), corroborando dessa forma, o mecanismo independente de insulina ou uma maior utilização de glicose pelos tecidos periféricos, que podem ser estudados em nível celular para uma melhor avaliação do mecanismo de ação.

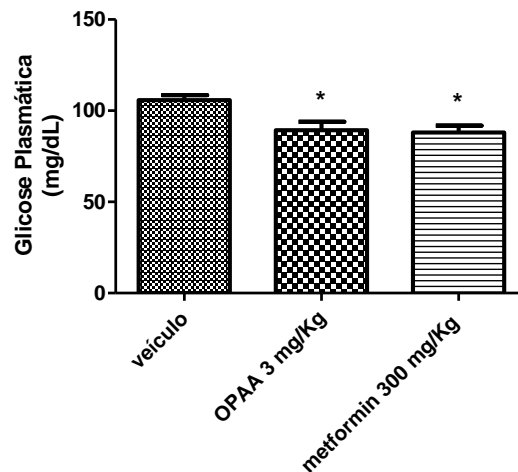


Figura 22. Efeito do OPAA no teste de tolerância à glicose no 5º dia de experimento em diferentes grupos de ratos normoglicêmicos tratados por administração oral do veículo (CONTROLE); OPAA na dose de 3 mg/Kg e cloridrato de metformina 300 mg/Kg. Cada barra representa a média e as linhas verticais demonstram o \pm DP (* $p < 0,05$).

No modelo de indução de diabetes do tipo 1 em ratos, quando os animais foram tratados com a administração oral de OPAA na dose de 3 mg/kg a mesma resposta hipoglicêmica foi observada de maneira significativa e continuamente por 24 dias, em comparação com o controle (veículo) (Figura 19). As conclusões das duas experiências aqui descritas são inéditas em relação à eficácia do OPAA em um modelo de diabetes e na elucidação de mecanismos de ação com uma dose baixa e, conseqüentemente, baixa toxicidade.

A presença de carotenóides e tocoferóis na polpa da macaúba, também podem explicar e sustentar os efeitos hipoglicemiantes e hipocolesterolêmico evidenciados nos níveis plasmáticos de glicose e colesterol total dos animais utilizados nesse estudo.

Em uma pesquisa conduzida por Coimbra *et al.* (2011), foi identificada a presença de carotenóides na polpa da macaúba com predominância do β -caroteno e de tocoferóis com predominância do α -tocoferol. Segundo Peckenpaugh (1997), as principais fontes de antioxidantes são as vitaminas C, D, E e β -betacaroteno (precursor da vitamina A). Acredita-se que estas vitaminas auxiliem na prevenção dos danos ocasionados pelo oxigênio radicalar aos vasos sanguíneos, reduzindo o processo de formação de placas nas paredes arteriais e também auxiliando na redução dos danos ocasionados no diabetes seja por inibir o processo de glicação de proteínas ou por inibir as catálises induzidas por metais de transição, devido a ação antioxidante.

O teste de tolerância à glicose sugere que os ratos normoglicêmicos tratados com OPAA na dose de 3 mg/Kg, quando comparado ao nível de glicose plasmática do jejum do grupo diabético induzido com estreptozotocina, demonstraram o mesmo efeito significativo na redução da glicose plasmática do jejum, de modo a se constatar, por esse experimento, a habilidade do OPAA de tolerar uma carga externa de glicose e insulina (BEST and TAYLOR, 1959).

Segundo Bergouignan (2009), o mecanismo protetor do ácido graxo oléico está relacionado bioquimicamente no diabetes à redução da incorporação do excesso de palmitato a diacilglicerol e ceramidas, sendo então o diacilglicerol totalmente convertido a triacilglicerol e o palmitato, direcionado a β -oxidação total. Com suplementação de oleato tem-se, portanto uma diminuição de diacilglicerol, ceramidas e acilcarnitinas radicalares (oriundas da β -oxidação incompleta do palmitato), uma redução da resistência à insulina e um consequente aumento de sua sensibilidade, além de reduzir a citotoxicidade celular (do processo de apoptose). Esses estudos embasam o mecanismo de resposta obtido nesse trabalho, demonstrado pelos efeitos antidiabético e hipoglicemiante nos diferentes modelos apresentados, na dose de 3 mg/Kg do OPAA, além do efeito hipocolesterêmico dose dependente de 30 mg/Kg desse mesmo óleo.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o óleo da polpa de *A. aculeata*:

- Apresenta segurança, demonstrado pelos ensaios de toxicidade aguda (*in vivo*) e também não apresenta citotoxicidade em células epiteliais renais LLC-PK₁ (*in vitro*).
- Possui compostos bioativos (como ácido graxo oleico, β -carotenóides e α -tocoferóis) capazes de produzir um efeito hipoglicemiante e antidiabético e duradouro durante o tratamento do diabetes induzido por estreptozotocina, na administração oral de 3 mg/kg, além de reduzir os sinais clínicos de polidipsia.
- Possui atividade hipoglicemiante e antidiabética comprovada de maneira inédita neste estudo e que pode estar relacionada à presença de alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico) evidenciada nos estudos de caracterização.
- Os testes de tolerância à glicose sugerem que a atividade hipoglicemiante pode estar relacionada a um mecanismo independente de insulina, podendo agir em nível de tecidos periféricos (por um aumento da sensibilidade na captação de glicose).
- Na dose de 30 mg/kg observa-se um efeito hipocolesterêmico no controle dos níveis séricos de colesterol total. Porém, o mesmo efeito não foi observado no controle dos níveis séricos de triglicérides de ratos, já que estes níveis também não se apresentaram alterados.
- É um alimento funcional útil, sendo recomendada a sua ingestão. Além disso, poderia ser utilizado em formulações farmacêuticas como xaropes e suspensões.

5.1 Considerações finais

O Cerrado brasileiro tem sofrido um acelerado processo de ocupação agrícola e uma exploração extrativista predatória. Diante desse cenário, a única forma racional de garantir sua preservação é demonstrar o potencial de uso e a importância socioeconômica das espécies nativas. Além disso comprovou-se pelo trabalho de pesquisa desenvolvido, alternativas para o melhor aproveitamento do fruto da Macaúba, nativo da região, seja nos setores industriais alimentícios e farmacêuticos. Avaliamos dessa forma a viabilidade de sua utilização como produto farmacêutico por via oral, segura, no controle do diabetes do Tipo 1 com efeito hipoglicemiante e antidiabético, além de agir no controle de níveis séricos de colesterol total dose dependente, assim como também foi comprovado por estudos de Ramiro (2010) o seu efeito no controle do diabetes do Tipo 2 e no quadro de dislipidemia.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: aproveitamento alimentar**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 13. Ed.
2. ALSALEH, F. M.; SMITH, F. J.; TAYLOR, K. M. Experiences of children/young people and their parents, using insulin pump therapy for the management of type 1 diabetes: qualitative review. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 37, 140–147, 2012.
3. BERGOUIGNAN, A.; MOMKENA, I.; SCHOELLER, A.D.; SIMON, C.; BLANC, S. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: The Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. **Progress in Lipid Research**, 48, 128–147, 2009.
4. BERRY, E.. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. **Am. J. Clin. Nutr.**, 66 (suppl), 991S-7S, 1997.
5. BEST, C.H.; TAYLOR, A.. **Physiological Basis of Medical Practice**. Williams and Wilkins, Baltimore, 6th Ed., p.668.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde**. 2006. cap. 1, pag. 9.
7. CESAR, E. Biodiesel no tanque. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, 94 ed., dez. 2003.
8. CIPRIANO, R. **Descobrimo o poder da macaúba**. <http://www.embrapa.br/noticias>
9. CLOUATRE, D.L.; RAO, S.N.; PREUSS, H.G.. Bitter Melon Extracts in Diabetic and Normal Rats Favorably Influence Blood Glucose and Blood Pressure Regulation. **J Med Food.**, 14 (0), 1–9, 2011.
10. COIMBRA, M.C.; JORGE, N.. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jervá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**, 44, 2139–2142, 2011.
11. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. EDITORA DA UNICAMP, 1997, 279 p.
12. COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3ª. ed. atual. e ampl. - Barueri, SP: Manole, 2009.
13. CUKIER, C.; MAGNONI, D.; ALVAREZ, T. **Nutrição baseada na fisiologia dos órgãos e sistemas**. São Paulo: SARVIER, 2005. cap.6, p.47-54.
14. CURTI, F. **Efeito da maçã gala (*Malus domestica Borkh*) na lipidemia de ratos hipercolesterolêmicos**. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2003.

15. EVANS, M.; TURTON, H. E.; GRANT, C. M.; DAWES, I. W. Toxicity of Linoleic Acid Hydroperoxide to *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of a Respiration-Related Process for Maximal Sensitivity and Adaptive Response. **Journal of Bacteriology**, vol. 180, n. 3, p. 483–490, fev. 1998.
16. FRUITS from America: an ethnobotanical inventory *Acrocomia aculeata*. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/Acrocomiaaculeata.htm> Acesso em: 25 de novembro de 2011.
17. GERALDO, J.M.; ALFENAS, R.C.G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica – evidências atuais. Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.52, p.951-967, maio. 2008.
18. GROSS, D. J.; SIDI, H.; WEISS, L. et al. Prevention of Diabetes Mellitus in non-obese diabetic mice by Linomide, a novel immunomodulating drug. **Diabetologia**, 37, 1195-1201, 1994.
19. HAMDEN, K., ALLOUCHE, N., DAMAK, M., ELFEDI, A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. **Chemico-Biological Interactions**. v.180, p.421-432. 2009.
20. HARGROVE, R. L.; ETHELTON, T. D.; PEARSON, T. A.; HARRISON, E. H.; KRIS-ETHELTON, P. M. Low Fat and High Monounsaturated Fat Diets Decrease Human Low Density Lipoprotein Oxidative Susceptibility In Vitro. **Journal of nutrition**, 131(6): 1758-63, jun. 2001.
21. HARRI, L.; SOUZA, H. M. de.; COSTA, J. T. de M.; CERQUEIRA, L. S. C. de. V.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2004. cap. 1, pag. 34-36.
22. HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **Field Guide to the Palms of the Americas** New Jersey: Princeton University, 1995. p.166-167.
23. HIANE, P. A., FILHO, M. M. R., RAMOS, M. I. L., MACEDO, M. L. R. Bocaiúva, *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd., Pulp and Kernel Oils: Characterization and Fatty Acid Composition. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.8, n.3, p.256-259, jul./set. 2005.
24. HUNT, J.V.; SMITH, C.C.T.; WOLFF, S.P.. Autoxidative glycosilation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. **Diabetes**, 39: 1420-4, 1990.
25. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: IV Ed., Edição Digital, 2008.
26. IBAMA <http://www.ibama.gov.br> acesso em 04/11/2011.
27. LLERAS, E.; CORADIN, L. Palmeras nativas como oleoginosas: situación actual y perspectivas para América Latina. In: Taller sobre Oleoginosas Promissoras, Bogotá, **Resumos. Bogotá**: ACAC, p. 91-143, 1985.

28. LIMA, E. S., FELFILI, J. M., MARIMON, B. S. SCARIOT, A. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado *sensu stricto* no Brasil Central – DF. **Revista Brasil**. Botucatu, v.26, n.3, p.361-370, set. 2003.
29. LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Lodd.) ex Mart. – arecaceae bases para o extrativismo sustentável. **Tese de Doutorado**, UFP, Curitiba, 2006, p.172.
30. LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 1992.
31. MAHAN, L. K. Krause: **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**/ editado por L. Kathleen Mahan, Sylvia Escott-Stump; 10.ed. São Paulo: Roca, 2002.
32. MAURO, R.A.; AGUIAR, L.M.S.; SILVA, M. P.; POTT, A. & POTT, V. J. **Fauna e Flora do Cerrado**, Campo Grande, Junho 2004. Disponível em: < <http://www.cnpqg.embrapa.br/~rodiney/series/> >. Acesso em 4 junho de 2010.
33. MEKONNEN, N.; HOUGHTON, P.; TIMBRELL, J.. The Toxicity of Extracts of Plant Parts of *Moringa stenopetala* in HEPG2 Cells in vitro. **Phytother. Res.**, 19, p. 870-875, 2005.
34. MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Acrocomia aculeata* Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: 16 out. 2005.
35. MOORE, A.; DONAHUE, C.J.; BAUER, K.D.; MATHER, J.P.. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. **Methods Cell Biol.**, 57: 265–78, 1998.
36. MORETO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.
37. MOUNDRAS, C.; BEHR, S. R.; DEMIGNÉ, C.; MAZUR, A.; RÉMESY, C. Fermentable polysaccharides that enhance fecal bile acid excretion lower plasma cholesterol and apolipoprotein E-rich HDL in rats. **Journal of Nutrition**, v.120, p.2179-2188, 1994.
38. NAGARAJU, A., LOKESH, B. R. Interesterified coconut oil blends with groundnut oil or olive oil exhibit greater hypocholesterolemic effects compared with their respective physical blends in rats. **Nutrition Research**. v.27, p.580-586. June 2007.
39. NELSON, G.J. Dietary fatty acids and lipids metabolism. In: CHOW, C.K. (ed.) **Fatty acids in foods and their health implications**. Nova York, Marcel Dekker, 1992.
40. OETTERER, M.; REGITANDO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006.
41. PECKENPAUGH, N. J.; POLEMAN, C. M.; GÓES, M. C. M.; FAVANO, A. **Nutrição: essência e dietoterapia**. 7.ed. São Paulo: Roca, 1997.
42. PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas: Aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. 1.ed. Barueri, SP: Manole, 2003.

43. PÉREZ, G.S.; PÉREZ, G.R.M.; PÉREZ, G.C.; ZAVALA, S.M.A., VARGAS, S.R.. Coyolosa, a new hypoglycemic from *Acrocomia mexicana*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**. 72: 105-111, 1997.
44. PHILIPPI, S. T. **Pirâmide dos Alimentos: fundamentos básicos da nutrição (Guias de nutrição e alimentação)**. 1.ed.Barueri, SP: Manole, 2008.
45. RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. .M. de A. Qualidade nutricional da polpa da bociáúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.28 (Supl.): p.90-94, dez. 2008.
46. RAMIRO, M. M. Efeito antilipidêmico do óleo extraído da polpa de *Acrocomia aculeata* (macaúba) em modelo experimental de hipercolesterolemia e hipertrigliceremia induzida pela dieta rica em frutose e gordura animal em ratos machos Wistar. **Dissertação de Mestrado**, UCDB, Campo Grande, 2010.
47. REAVEN, P. Dietary and pharmacologic regiments to reduce lipid peroxidation in non-insulin-depended diabetes mellitus. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 62, 1483S-9S, 1995.
48. REIS, S. B.; SIMÕES, M. O. M.; RIBEIRO, M. L.; NERY, L. A.; SANTOS H. C. M. **Avaliação histoquímica de lipídeos em frutos em desenvolvimento de *Acrocomia aculeata* Jacq. Lodd. Ex. Martius (Arecaceae)**. III Fórum Gestão/Pesuisa/Ensino/Extensão. Unimontes – Universidade Estadual de Montes Claros –MG. Setembro de 2009.
49. RENAUD, S.C. Dietary management of cardiovascular diseases. University Bordeaux, France. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.57, p.423-427, Abr.1997.
50. RODRIGUES, V. E. G.; RODRIGUES, D. A. de C. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, cap. 1, p.11, 2001.
51. RODRIGUES, H. S.. Obtenção de ésteres etílicos e metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira latino americana macaúba-*Acrocomia aculeata*. **Tese de Doutorado**, USP, Ribeirão Preto, 2007, p.174.
52. ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity *in vitro*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 30(3): 814-821, jul-set, 2010.
53. SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado-ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados - CPAC, 1998. 556 p.
54. SIMOPOULOS, A.P. Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acid. **Food Rev. Int.**, v.16, n.1, p.113-7, 2000.
55. SILVA, D. B.; SILVA, J. A da.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do Cerrado**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2001. 1.ed. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

56. SILVA, J. A. et al. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília, DF: EMBRAPA, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados – CPAC, 1994. 166 p.
57. SOARES, J. C. M.; COSTA, S. T.; CECIM, M.. Níveis glicêmicos e de Colesterol em Ratos com *Diabetes mellitus* Aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 113-118, 2000.
58. SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H. American palms used for medicine, in the ethnobotanical and pharmacological publications. **Rev. peru. biol.**, 15 (supl. 1): 143-146, 2008
59. SOUSA, D. M. G de.; LOBATO, E. **Cerrado – correção do solo e adubação**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 2. ed.
60. SOUSA, R. V. de., SANTOS, P. C. F., BAMBIRRA, E. A., VIEIRA, E. C., ALVAREZ-LEITE, J. I. Nutritional Characteristics of Amazonian Fish Fat (*Colossoma macropomum*) and its Effect on Lipid Metabolismo of Rats Fed Hypercholesterolemic Diets. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.22, n.1, p.88-93, jan./abr. 2002.
61. SRIVASTAVA, S.P.; MISHRA, A.; BHATIA, V.; NARENDER, T.; SRIVASTAVA, A.K. Acacia catechu hard wood: potential anti-diabetic cum anti-dyslipidemic. **Med Chem Res**, 20:1732–1739, 2011.
62. TARIQ, M.; ALI, S.; AHMAD, F; AHMAD, M.; SAFAR, M. Identification, FT-IR, NMR (¹H and ¹³C) and GC/MS studies of fatty acid methyl esters in biodiesel from rocket seed oil. **Fuel Proces. Tech.**, 92, 336-341, 2011.
63. VIEJO J.; MUNIZ, F. J. S.; ARIAS, M. T. G.; BASTIDA, S.; LINARES, M. C. G. Effect of Olive Oil-fried Sardine Consumption on Liver Lipid Composition and Fatty Acid Cholesterol Esterification in Hypercholesterolemic Rats. **Food Science and Technology International**, v.64, n.21, p.329-338, July 2003.
64. World Health Organization. Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. **Nutr. Rev.**, 53(7):202-5, 1995.
65. WU, K. K.; HUAN, Y.. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, 5.47.1-5.47.14, Março 2008.
66. YWATA, C.; ANTÔNIO, J.; CORDEIRO, R. **A cura está na natureza – Medicina Natural**. São Paulo – SP: Brasil 21 Ltda., 1999. cap. 1, pag. 9-10.
67. ZENENBOM, O. PASCUET, N. S.; TIGLEA. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz**. 5.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p.1020.

7- ARTIGO

Hypoglycemic and antidiabetic activity and toxicity of *Acrocomia aculeata* in rats

Perla Villani BORGES DA SILVA^a, Marianne Moreira RAMIRO^d, Priscila Vinholi NEVES^a, William AYALA CORRÊA^a, Jennifer LOWE^c, Cândida Aparecida Leite KASSUYA^b, Rozanna Marques MUZZI^{a*}

^aUniversidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia

^b Universidade Federal da Grande Dourados, Faculdade de Ciências da Saúde

^c Universidade Federal do Rio de Janeiro

^d Universidade Católica Dom Bosco

ABSTRACT - Plants from *Acronomia* genus are recognized in Brazilian food and traditional medicine to treat the cardiovascular and inflammatory diseases. No scientific data have been published supporting *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. (Palmaceae), popularly known as “bocaiuva”, antidiabetic effect. In the present study, the fruit’s pulp *A. aculeata* palm oil (PAAPO) were evaluated for antidiabetic models in rat such as streptozotocin-induced diabetes and fructose-induced diabetes in rats and toxicological analysis were investigated by *in vivo* and *in vitro*. The oral administration of PAAPO (3, 30 and 300 mg/kg), significantly decreased the high glucose levels induced by fructose-diet in rats. Additionally, the oral persistent treatment with PAAPO (3 mg/kg) for 24 days reduced the high plasmatic glucose induced by streptozotocin in rats. In normoglycemic animals, the oral administration of PAAPO (3 mg/kg), significantly decreased the glucose levels. No signs of toxicity were verified in acute toxicity in rats with dose of 3 g/kg or in LLC- PK₁ cells cytotoxicity assay in the range of 5 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL and 500 µg/mL of PAAPO. The results suggest that PAAPO possess anti-diabetic and hypoglycemic effects without toxicity. Considering that drugs currently available for the treatment of diabetes showed undesirable side effects, the present results may have clinical relevance and open new possibilities for the development of new hypoglycemic drugs.

1. Introduction

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd (Palmaceae), popularly known as “bocaiuva, chiclete-de-baiano, baboso coconut, catarro coconut, espinho coconut, macacauba, macaiba, macaibeira, macajuba, macaúba, macaúva, mucaia, mucaja and mucajaba” (Teixeira, 1996), is widely distributed in Mato Grosso do Sul State, Brazil (Lorenzi, 2006). Plants from *Acronomia* genus are recognized in Brazilian food and traditional medicine to treat the cardiovascular and inflammatory diseases. The pulp and the kernel of this fruit are consumed *in natura* by the local population or in prepared cuisine, such as ice cream, cakes, peanut candy, coconut sweets, and can enrich the diet as an additional source of essential nutrients (Almeida, 1998). Different species of this genus also are found in this state, in southeastern Brazil and Central America (Hiane *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008).

About the nutritional potential, *A. aculeata* pulp are chemical constituted by minerals, such as, cooper, zinc and potassium and also rich in β-carotene, a precursor of Vitamin A (Ramos *et al.*, 2008). In other studies show that the oil of fresh pulp, pulp flour and kernels were rich in fatty acids, with predominance of oleic acid (monounsaturated fatty acids) in

levels similar to those found in the fruit of other palm trees (Hiane *et al.*, 2005). These monounsaturated fatty acids have antioxidant properties against cellular damage that inhibit induced catalysis by transition metals (Berry, 1997) and furthermore inhibit proteins' glycosylation (mainly lysine-proteases) (Reaven, 1997), which represent the major complications of diabetes. Its antioxidant properties also improve insulin resistance, and consequent reduction of glucose (Bergouignan, 2009). Also found n-3 family of fatty acids, the linoleic acid, with values higher when compared to the values other oilseeds (corn, olive, sunflower) (Hiane *et al.*, 2005). Previous reports showed that fruits of *A. aculeata* may be a very good source of provitamin A carotenoids in that rats with vitamin A deficiency (Ramos *et al.*, 2007).

The roots of *A. aculeata* have been used for a long time by indigenous people in states of Yucatan and Tamaulipas in Mexico for treatment of diabetes (Sosnowska and Balslev, 2008). In this context, hypoglycemic compounds were isolated and tested pharmacologically *in vivo* to confirm this activity, and showed a significant blood sugar lowering effect, in a dose-dependent manner, on normal and alloxan-diabetic mice (Perez *et al.*, 1997).

The present work aimed to evaluate the anti-diabetic action of fruit's pulp *A. aculeata* palm oil (PAAPO) in experimental models of diabetes Type 1 (streptozotocin-induced) and Type 2 (fructose-induced) as well the toxicological analysis.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Chemicals

Hexane P.A. (Dinamic); Rotaevaporator (Marconi MA-120); Streptozotocin (Sigma-Aldrich); 50 mM sodium citrate (enzyme grade; Fisher) buffer, pH 4.5: prepared just before use; 10% (w/v) sucrose (Sigma): prepared just before use; Rodent cages; 3 ml syringes; One Touch Basic blood glucose monitoring system (Lifescan); Metformin hydrochloride (Medley); EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid 5% (Laborclin); Ketamin (Cristália); Xilazin (Assedavan); Fructose (Kosher); Animal fat - Pork (Sadia); Standard rodent chow diet (Purina); Triglycerides and total cholesterol colorimetric assay kits (Labtest); LLC-PK₁ cells (renal epithelial cells derived from proximal tubules) obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Grand Island – NY, USA); Phosphate Buffered Saline (PBS); Propidium iodide (Calbiochem, San Diego, CA); Filtro HEPA (JetBiofil®);

2.1.2. Plant material

Fruits of *A. aculeata* (Jacq.) Lodd. were collected from the Dourados-Panambizinho, region of Alto Café (Dourados, MS), voucher specimen (excicata) deposited (no. 2169) in the herbarium of the Federal University of Grande Dourados in March 2010 and February of 2011.

2.1.3. Animals

The experiments were conducted using male *Wistar* rats (150—300 g), housed under 12 h light-dark cycle, controlled humidity (60—80%), and temperature (22° ± 1°C) conditions. Food and water were freely available to the rats. The animals were acclimatized to

the experimentation room for at least 2 h before testing and were used only once throughout the experiments. The studies reported in this manuscript were carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals and following the guidelines set by the U.S. National Institute of Health and was approved by the ethics committee for research on laboratory-animal use of the institution (Nbr 010/2011). The number of animals was the minimum necessary to show consistent effects of the drug treatments.

The effect of PAAPO was studied on the blood glucose level of normal rats; separate experiments were performed to study this effect on the blood glucose level of streptozotocin-induced diabetic rats and fructose-induced diabetic rats.

2.2. Methods

2.2.1. Extraction

Fresh mesocarps of *A. aculeata*, previously washed and cut into small pieces, were placed in different trays and dried in an oven with ventilation, a temperature of 50 ° C for 2 h. After this procedure, the material (500 g) was extracted by solvent Hexane (1 l) for 7 days, in the dark. After this period, the mixture hexane solution obtained was filtered and concentrated at 50° C in rotaevaporator. It was extracted from mesocarps according to Oetterer, 2006.

2.2.2. Cell culture and treatment

LLC-PK₁ cells (renal epithelial) were maintained in DMEM medium without supplemented fetal bovine serum at 37 °C in a humidified 95% air/5% CO₂ incubator for 48 h. For assays, the cells were plated at a density of 2 x 10⁴ cells/well in 24-well plates and exposed to various concentrations of the PAAPO that was dissolved in the culture medium and sterilized by filtration. The cells were incubated for with 0 µg/mL, 5 µg/mL, 50 µg/mL, 250 µg/mL e 500 µg/mL of the test material for 3, 6 and 18 h. Controls were not treated with PAAPO, received the vehicle only (Mekonnen *et al.*, 2005).

2.2.2.1. Determination of cell viability

Cell viability was measured by quantitative colorimetric assay with propidium iodide. Briefly, after treatment, one hour before the end of incubation period 1 µL of propidium iodide solution (final concentration, 1 mg/mL) was added and cells were incubated at 37 °C for 1 h. The dead cells, stained by propidium iodide, were counted by using fluorescence microscopy (Moore *et al.*, 1998).

2.2.3. Acute Oral Toxicity assay in vivo

Initially, 12 rats were randomly divided into two groups of six animals that were control group that was given orally only vehicle and PAAPO 3 g/kg group. Toxic symptoms and number of rats which died in each group after 48 h observation were recorded. This assay was performed in according to the method described in OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (OECD 423, 2001).

2.2.4. Fructose-induced diabetes in rats and glucose measurements

After one week of acclimatization the animals were divided into two batches. One batch was provided with a control diet containing starch as the source of carbohydrate and the other was fed with a fructose-enriched diet for six months. The composition of the diets is the enriched of a commercial diet with fructose (60 %) and animal fat (7 %) (Dai e McNeill, 1995). During this period, biochemical tests were performed periodically verified by testing the blood glucose level from a tail vein sample using a One Touch Basic blood glucose monitoring system (after fast all rats for 6 h), to check changes.

At the beginning of the seventh month, after the animals have presented a framework installed dyslipidemia, rats in each set were subdivided randomly into five groups. The following experimental groups, consisting of six rats each, were maintained as follows: Group 1. Naïve - received the control diet without fructose, Group 2. Control - Fructose-fed animals received the fructose-enriched, Group 3. Fructose-fed animals received the fructose diet and PAAPO (3 mg/kg), Group 4. Fructose-fed animals received the fructose diet and PAAPO (30 mg/kg), and Group 5. Fructose-fed animals received the fructose diet and PAAPO (300 mg/kg)

After five consecutive days of treatment, different groups of rats were fasted at least 6 h prior to the test, but with given water *ad libitum*. All rats also received an intraperitoneal anesthesia with ketamine and xilasin and blood samples were collected from the rat tail vein serum glucose levels were measured by the glucose oxidase method (Trinder, 1969) using commercial kit (Labtest).

2.2.5. Streptozotocin-induced Type 1 Diabetes Mellitus in Rats

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 65 mg/kg streptozotocin (STZ), diluted in 0.1M sodium-citrate buffer (pH 4.5). Control rats received an equivalent amount of the buffer. STZ-treated rats received 10% of glucose instead of water for 24 h after diabetes induction in order to reduce death due to hypoglycemic shock in the STZ group. The samples of blood were taken 24 h after STZ or vehicle injection from the tail vein. Glucose levels were measured by the glucose oxidase method (Trinder, 1969) using commercial kit (Labtest). Only animals with fasting glycemia over 250 mg/dl were considered diabetic.

After 14 days of adaptation and complete diabetic state, verified by testing the blood glucose level from a tail vein sample by the glucose oxidase method (Trinder, 1969) using commercial kit (Labtest) to check hyperglycemia (after fast all rats for 6 h), the animals with a blood sugar of 250 mg/dL or more were included in the diabetic groups. Groups of rats in each set were subdivided randomly into three groups. The following experimental groups, consisting of six rats each, were maintained as follows: Group 1. Naïve - (non-diabetic, not induced), Group 2. Control - Induced diabetic control treated with vehicle, Group 3. Induced diabetic treated with PAAPO (3 mg/kg).

Fasting plasma glucose was determined at days 21, 28, 32 and 38 after induction of state diabetic with streptozotocin, and the continuous oral treatment of the groups induced diabetic, with PAAPO and vehicle. The experiment was conducted in accordance to WU et Huan, 2008. Daily per cage food and water consumption were recorded at 8:00 h. Animal body weights of each group were measured weekly (Soares *et al.*, 2000).

2.2.6. Oral glucose tolerance test in normoglycemic rats

This experiment aims to evaluate the hypoglycemic potential of the PAAPO in normal rats as described by Al-Awadi et al (1985). Initially, 18 rats were randomly divided into three

groups of six animals that were control group that received only vehicle, PAAPO 3 mg/kg group and metformin 300 mg/kg. Respective treatment were made daily for five days.

On the 5th day, different groups of rats were fasted for 6 h prior to the test, but with given water *ad libitum*. Each rat was given an oral glucose load, 2 g/kg body weight according to Al-Awadi *et al* (1985) and after 30 min were administrated in the different groups: vehicle, PAAPO and metformin. 60 minutes after the glucose load all rats were immobilized and blood samples were collected from the rat tail vein and. Serum glucose levels were measured by the glucose oxidase method (Trinder, 1969) using commercial kit (Labtest).

2.2.7. Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SD values. The data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test to determine whether means were significantly different from the control. Difference was considered statistically significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Cell culture and treatment

There was no significant decrease in the number of viable renal epithelial cells line after incubating the cells with the highest concentration (500 $\mu\text{g/mL}$) of PAAPO and 18 h compared with control (figure 1). This result indicates that PAAPO have no citotoxicity in renal epithelial cells, being safe to be tested *in vivo*.

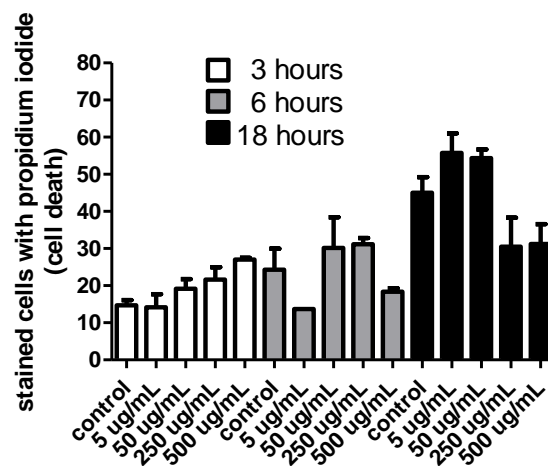


Figure 1. Viability of cultured cells LLC-PK₁ (in number of cell death) as measured by propidium iodide exclusion after incubation for 3, 6 and 18 h with different concentrations of PAAPO 5, 50, 250 and 500 $\mu\text{g/mL}$. Each bar represents the mean with $n = 2$ and the vertical lines show the S.E.M. Asterisks denote the significance levels in comparison with the control group (one-way ANOVA followed by Tukey test). ($*P < 0.05$).

3.2. Acute Oral Toxicity assay in vivo

No toxic symptoms and mortalities were reported following oral administration of the PAAPO to rats in dose up to 3 g/kg until 48 h post-administration. This result indicates that PAAPO have high safety in rats.

3.3. Diet rich in Fructose-induced Type 2 Diabetes

As shown in figure 2, oral administration of PAAPO 3, 30 and 300 mg/kg to hyperglycemic rats for 5 days caused significant decreases the level of plasma glucose, compared to the hyperglycemic control group.

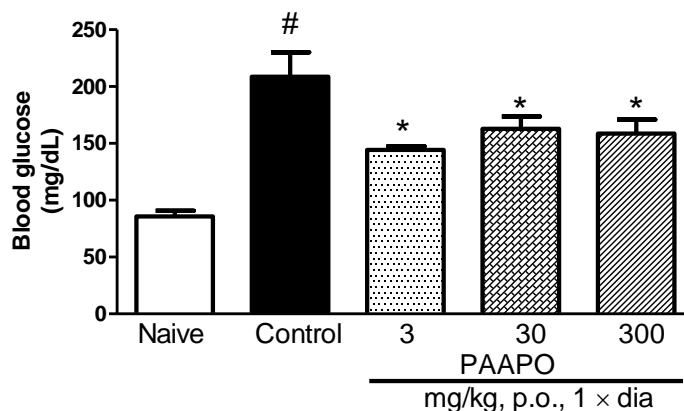


Figure 2. Effects of oral treatment with PAAPO on the increase of glucose levels in high fructose-diet Type 2 diabetes in rats. Different groups of hyperglycemic rats were treated with oral administration PAAPO 3, 30 and 300 mg/kg and vehicle (CONTROL) every day (once a day) for 5 days. In the day of experiment, the animals were treated with PAAPO or vehicle and after 60 minutes, samples of blood were collected and the glucose content was analyzed. The group rats NAIVE represents the control diet without fructose. Each bar represents the mean of six animals and the vertical lines show the S.D. Asterisks denote the significance levels in comparison with the control group (one-way ANOVA followed by Tukey test). (* $P < 0.05$).

As demonstrated in this experiment the same level of hypoglycemic activity of PAAPO at all doses tested, and with the lower dose of 3 mg/Kg the effect was even more effective, it was decided in the streptozotocin-induced Type 1 Diabetes Mellitus assay only to test the lowest dose of the oil in order to reduce toxicity.

3.4. Streptozotocin-induced Type 1 Diabetes Mellitus in Rats

The blood glucose levels of the animals were monitored and the results are shown in Fig. 3. The administration of PAAPO at a dose of 3 mg/Kg/day/animal resulted in rapid decrease of blood glucose levels within 7 days of treatment (21 days after STZ injection) compared with untreated diabetic control rats (vehicle). The continual treatment of diabetic rats with PAAPO reduced the blood glucose to the NAIVE level within one week and continually decreased for the next 24 days.

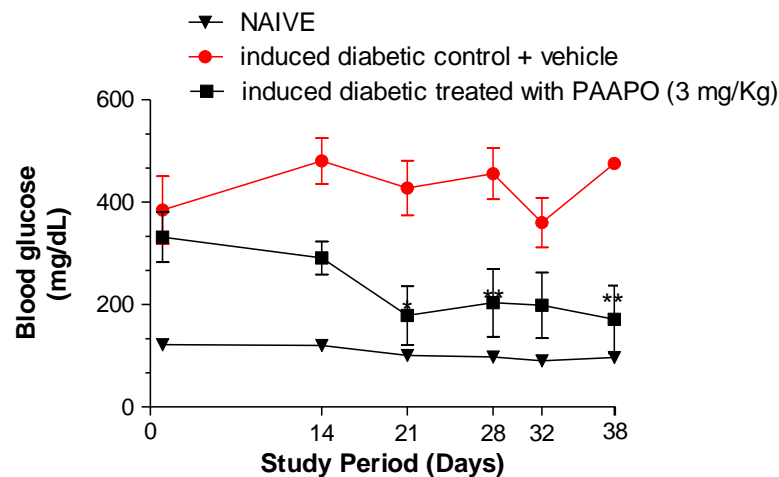


Figure 3. Effects of oral treatment with PAAPO on the increase of glucose levels in streptozotocin-induced Type 1 Diabetes Mellitus in rats. Different groups of hyperglycemic rats were treated with oral administration PAAPO 3 mg/kg and vehicle (CONTROL) every day (once a day) for 24 days. In the day of experiment, the animals were treated with PAAPO or vehicle and after 60 minutes, samples of blood were collected and the glucose content was analyzed. The group rats NAIVE represents the non-diabetic, not induced. Data were represented as mean of six animals and the vertical lines show the S.D. Asterisks denote the significance levels in comparison with the control group (one-way ANOVA followed by Tukey test). (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.005$).

Food and water intake were recorded, the induced diabetic group treated with PAAPO 3 mg/kg rats took an average of 29.5 ± 7.42 g of food and 54.36 ± 8.14 mL water per day per rat. The group normoglycemic rats (naïve) consumed an average of 28.25 ± 5.68 g of food and 56.89 ± 7.21 mL of water. There was no significant difference about the average food and water consumption between the PAAPO treated rats and the group normoglycemic rats (naïve) during the treatment. However, the untreated diabetic control (vehicle) rats showed a little higher level of the average food (32 ± 8.48 g) consumption and a significant higher level of the average water (83.11 ± 4.67 mL) consumption than the rats of the test groups.

Animal body weights of each group were monitored weekly throughout the study and the results showed the rats gained an average rate of about 20 g/week, which is no significant differences between groups normoglycemic (Naïve), untreated diabetic control (vehicle) and diabetics treated with PAAPO 3 mg/kg.

3.5. Oral glucose tolerance test in normoglycemic rats

The oral glucose tolerance test in normoglycemic rats was significantly altered with PAAPO 3 mg/Kg dose, an effect comparable to that of metformin (fig. 4). The metformin acts by increasing the sensitivity of liver, muscle, fat, and other tissues to the uptake and effects of insulin, these actions lower the level of sugar in the blood. The PAAPO at 3 mg/Kg dose showed the largest effect on the fasting blood glucose level in STZ-induced Type 1 diabetes and on the ability to tolerate an external glucose load and insulin demonstrated by this test (Best and Taylor, 1959).

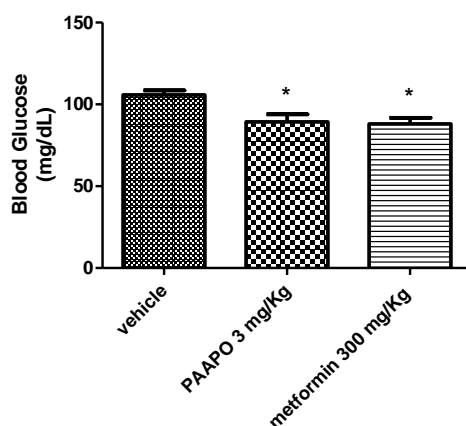


Figure 4. Effect of PAAPO on glucose tolerance in normal rats. Different groups of normoglycemic rats were treated with oral administration of vehicle, PAAPO 3 mg/kg and metformin every day (once a day) for 5 days. In the day of experiment, blood samples were collected from the tail vein after 60 minutes the glucose load and 30 minutes after the administration of vehicle, PAAPO or metformin. Each bar represents the mean of six animals and the vertical lines show the S.D. Asterisks denote the significance levels in comparison with the control group (one-way ANOVA followed by Tukey test). (* $P < 0.05$).

4. Discussion

Naturally monounsaturated fatty acids (oleic acid) usually exhibit antioxidant activities and the idea that they possess antioxidant against metal-induced catalysis is relevant of diabetes because many complications of diabetes are related in part to free radical damage and the oxidation is catalysed through transition metals. Hyperglycemia can lead to oxidative stress and protein and lipid modifications as investigated by Hunt et al., 1990. Thus, monounsaturated fatty acids-enriched diets might inhibit protein glycosylation and decrease advanced glycosylation end products (AGE), that are free radicals (Reaven, 1995). These effects on hyperglycemia may be the key for the glucose level control and has beneficial effects against diabetes. These findings have attracted our interest to explore this hypoglycemic and antidiabetic activity of PAAPO, that is rich in oleic acid, besides evaluate its *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* toxicity, to check safety.

In citotoxicity experiment, as showed at figure 1, PAAPO did not decrease renal epithelial cell viability up to 500 $\mu\text{g/mL}$ and 18 h of incubation compared with control, demonstrated by the number of death cells stained with propidium iodide. Thus, no significant general citotoxicity was observed. Due to the low solubility of these fruit oil, it was not possible to increase the concentration in order to obtain an IC_{50} value. In toxicity experiment *in vivo* showed that orally administrated of PAAPO 3 g/Kg until 48 post-administration did not produce any death, clinical signs, or gross alterations attributable to hepatic toxicity or other organ damage if compared to a control group that received saline solution. In addition, the *in vitro* and *in vivo* methods was able to demonstrate that the PAAPO could be safe to be tested in the diabetes activity models since it showed no toxicity in rats and renal epithelial cells.

The mechanism of decrease the blood glucose levels seem in diabetic rats given orally PAAPO 3 mg/Kg in both models of diabetes, reported in this study, may include the previously reported antioxidant and hypoglycemic effects of monounsaturated fatty acids (oleic acid) (Berry, 1997 and Pérez *et al.*, 1997). In the present studies the PAAPO has been studied as an antidiabetic model. The results, described in Figure 2, demonstrate the

hypoglycemic activity of the oil at all concentrations tested in the model of Type 2 diabetes, may be useful in controlling the blood glucose level in mild diabetes. Thus, confirming the mechanism independent of insulin or due an increased utilization of glucose by peripheral tissues. In the diabetes-induced Type 1 rats model, when rats were treated with oral administration of PAAPO at a dose of 3 mg/Kg also exhibited a hypoglycemic response (figure 3). It is remarkable that significant blood glucose decrease continually for 24 days with a relatively low dose of PAAPO (3 mg/Kg), as compared to the untreated control (vehicle). The findings of the two experiments described here are over with regard to the efficacy in a model of diabetes of PAAPO extract and in elucidating mechanisms of action with a low dose and consequently low toxicity.

In relation to water and food consumption were not detected any difference between groups in daily food intake, but in relation to water consumption can be observed that the induced diabetic group treated with PAAPO (3 mg/Kg) showed the same consumer that the groups normoglycemic (Naïve), also suggesting a normalization of clinical signs of Type 1 diabetes polydipsia.

As show at the oral glucose tolerance test in normoglycemic rats, figure 4, the results demonstrate that PAAPO (3 mg/Kg) reduce the blood sugar levels of the nondiabetic animals (leading to hypoglycemia) and similarly gave indication of leading to hypoglycemia in the diabetic model at the dosage tested (Clouatre *et al.*, 2011). The hypoglycemic effect detected may be similar to Metformin and possibly due to a mechanism independent of insulin or an increased utilization of glucose by peripheral tissues, that may be studied at the cellular level for better evaluation of the mechanism of action.

In conclusion, the pulp *Acrocomia aculeate* palm oil have high safety in rats (*in vivo*) and LLC-PK₁ renal epithelial cells (*in vitro*). The present work has demonstrated that oral administration of PAAPO produced a stable and long-lasting (24 days) control of glycaemic status in STZ-induced diabetic rats with the dose of 3 mg/kg and reduce clinical signs of polydipsia. It was also effective in reducing the hyperglycemia in the model of Type 2 diabetes (induced by fructose-enriched diet) at the same dose. This hypoglycemic and antidiabetic activity may be related to the presence of high concentration of monounsaturated fatty acid (oleic acid) by a mechanism independent of insulin and may be acting at peripheral tissues, confirmed by glucose tolerance test. Therefore, this study recommends that intake of pulp *Acrocomia aculeate* palm oil as a functional food may be useful for diabetic patients.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are thankful to Dr. Antônio Jorge Vieira, University Federal of Rio de Janeiro (UFRJ), NPPN for supporting in chemical analyses and to Dr. Adalberto Vieyra, IBCCF-UFRJ for supporting in biological assays.

References

- Almeida, S. P., 1998. **Cerrado**: aproveitamento alimentar. Planaltina: Embrapa-CPAC, 188p.
- Best, C.H., Taylor, A. Physiological Basis of Medical Practice. Williams and Wilkins, Baltimore, 6th Ed., p.668.

- Bergouignan, A., Momken, I., Schoeller, D.A., Simon, C., Blanc, S., 2009. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: The Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Progress in lipid research*. 48, p. 128-147.
- Berry, E., 1997. "Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus". *Am. J. Clin. Nutr.* 66 (suppl), 991S-7S.
- Clouatre, D.L., Rao, S.N., Preuss, H.G., 2011. Bitter Melon Extracts in Diabetic and Normal Rats Favorably Influence Blood Glucose and Blood Pressure Regulation. *J Med Food*. 14 (0), 1-9.
- Hiane, P. A.; Filho, M. M. R.; Ramos, M. I. L.; Macedo, M. L. R., 2005. Bocaiúva, *Acrocomia aculeate* (Jacq.) Lodd., Pulp and Kernel Oils: Characterization and Fatty Acid Composition. *Braz. J. Food Technol.* v. 8, n.3, p. 256-259.
- Hunt, J.V., Smith, C.C.T., Wolff, S.P., 1990. Autoxidative glycosilation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*. 39: 1420-4.
- Mekonnen, N., Houghton, P., Timbrell, J., 2005. The Toxicity of Extracts of Plant Parts of *Moringa stenopetala* in HEPG2 Cells in vitro. *Phytother. Res.* 19, p. 870-875.
- Moore, A., Donahue, C.J., Bauer, K.D., Mather, J.P., 1998. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol.* 57: 265-78.
- Oetterer, M., Regitano-D`Arce, M.A.B., Spoto, M.H.F., 2006. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri, SP: Manole.
- Pérez, G.S., Pérez, G.R.M., Pérez, G.C., Zavala, S.M.A., Vargas, S.R., 1997. Coyolosa, a new hypoglycemic from *Acrocomia mexicana*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 72: 105-111.
- Reaven, P., 1995. Dietary and pharmacologic regiments to reduce lipid peroxidation in non-insulin-depedent diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* n. 62, 1483S-9S.
- Soares, J.C.M., Costa, S.T., Cecim, M., 2000. Níveis glicêmicos e de Colesterol em Ratos com *Diabetes mellitus* Aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. *Ciência Rural*. v. 30, n. 1, p. 113-118.
- Sosnowska, J., Balslev, H., 2008. American palms used for medicine, in the ethnobotanical and pharmacological publications. *Rev. peru. biol.* 15 (supl. 1): 143-146.
- Wu, K.K., Huan, Y., 2008. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology*. 5.47.1-5.47.14.