

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Teor de constituintes, avaliação antioxidante, efeitos antidiabéticos, antiglicação e anticolinesterásica de raízes *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. em Ratos Wistar.

THIAGO FÉLIX DE MIRANDA PEDROSO

DOURADOS, MS

2017

THIAGO FÉLIX DE MIRANDA PEDROSO

Teor de constituintes, avaliação antioxidante, efeitos antidiabéticos, antiglicação, anticolinesterásica de raízes *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. em Ratos Wistar.

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: VIRGINIA DEMARCHI KAPPEL TRICHEZ

DOURADOS, MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P372t Pedroso, Thiago Felix De Miranda

Teor de constituintes, avaliação antioxidante, efeitos antidiabéticos, antiglicação e anticolinesterásica de raízes *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. em Ratos Wistar. [recurso eletrônico] / Thiago Felix De Miranda Pedroso. -- 2018.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: VIRGINIA DEMARCHI KAPPLE TRICHEZ.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2017.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. *Cochlospermum regium*. 2. diabetes. 3. antioxidantes. 4. AGEs. 5. aloxano. I. Trichez, Virginia Demarchi Kapple. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR THIAGO FÉLIX DE MIRANDA PEDROSO, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 07 DE JUNHO DE 2017.

Ao sétimo dia do mês de junho do ano de dois mil e dezessete (07/06/2017), às 08h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Teor de constituintes, avaliação antioxidante, efeitos antidiabéticos, antiglicação, anticolinesterásica de raízes *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg., em Ratos Wistar" apresentada pelo mestrando THIAGO FÉLIX DE MIRANDA PEDROSO, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores Dra. Virginia Demarchi Kappel Trichez (Presidente/orientador), Dr. Nelson C. Farias Junior (membro titular/externo) e Dra. Raquel dos Santos Donatini (membro titular/externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 20 até 30 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 07 de junho de 2017.

Dra. Virginia Demarchi Kappel Trichez

Dr. Nelson C. Farias Junior

Dra. Raquel dos Santos Donatini

ATA HOMOLOGADA EM: 14/12/2018, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

Prof. Dr. Nelson Luis de Campos
Domingues
Pró-Reitor de Ensino de Pós-
Graduação e Pesquisa em exercício

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por essa oportunidade maravilhosa que é viver. Foram tantos obstáculos, que no final das contas só me fizeram crescer ao olhar para trás. A sensação de vitória após os obstáculos vencidos me deram mais alegria e entusiasmo. Obrigado Criador do Universo, Inteligência Infinita que a tudo rege, desde o mais simples cintilar de uma gota de orvalho até a mais complexa via metabólica que nós experimentadores queremos tanto descobrir. Quero também aqui divinamente lembrar agradecer ao Mestre Galileu que tanto fez e faz por nos em nossa caminhada, e Sua Mãe que tão docemente intercede por nós.

Não nasci em berço de ouro, mas o conteúdo moral que obtive, foi por conta do exemplo familiar que vislumbrei na infância. Pessoas simples, mas corretas e de coração puro, que com suas características humildes não queriam mais do que a consciência limpa de uma vida justa e pacífica. Passando por todos os tios, tias, avós, primos, primas e todos que fazem parte de uma lista extensiva e familiar de paz e harmonia. Dentre estes faço menção digna de nota a Alinor Félix de Miranda Filho, exemplo de irmão, pai, tio, homem, professor, e que na minha vida teve influência particularmente benéfica.

Gostaria de lembrar o meu pai Walter da Silva Pedroso, que dentro da família se destacou em esforços para ser um cidadão de bem.

Com ênfase Divinal abro estas linhas fazendo referência a minha mãe, Felita Maria de Miranda, que praticamente doou sua vida para criar seu filho. Exemplo de humildade e tolerância. Foi com esta mulher que passei momentos de alegria e tristeza, dor e sorriso, e muitas outras experiências que fazem de mim este homem que sou. A palavra “obrigado”, não carrega em sua completude toda a vontade que tenho de agradecer por ser seu filho.

Ariadne de Santana Tolosa Pedroso, namorada, amiga, esposa, fortaleza... e adjetivos tais que fazem de você a melhor esposa para mim. Foi você que andou de mãos dadas comigo pelas calçadas de Barra do Garças – MT, foi com você que entrei de mãos dadas pelo corredor da igreja, e é com você que quero trilhar os caminhos que a vida nos proporcionou e nos

proporcionara. Tudo que temos conseguimos juntos, inclusive os anjos que escolheram viver no ventre de nossa família, Maria Luisa e Ana Clara, nossas filhas, a quem dedico felicidades mil.

Gostaria de lembrar a Prof^ª Dr^ª Zefa Valdevina, sua aluna Juliana Clementino e Sr. Adonias e Esposa que ajudaram na coleta da amostra vegetal. A Prof^ª Dr^ª Anelise Formagio e sua equipe auxiliando no teor de constituintes, avaliação antioxidante, anticolinesterásica e HPLC do extrato do *Cochlospermum regium*. Ao Prof^º Arquimedes e sua equipe, sempre tão solícitos em nos ajudar. A todos os técnicos da FCS-UFGD, a Prof^ª Dr^ª Priscila Neder Morato que nos ajudou durante a dieta hiperglicídica, Prof^ª Dr^ª Candida Kassuya e seu aluno Paulo Vasconcelos, que ajudou nos exames bioquímicos, Prof^º Dr^º Roosevelt e Prof^ª Dr^ª Ariane que ajudaram nas amostras teciduais, ao Prof^ª Dr^º Eriton Botero e seu aluno Flavio Santana Michels, que nos ajudou com o fluorímetro.

Agradecimentos ao CAPES pela bolsa.

E é com enorme satisfação que agradeço a minha humilde, sincera, e corajosa orientadora Prof^ª Dr^ª Virginia Demarchi Kappel Trichez. Agradeço ao criador por ter colocado você como minha orientadora. Só com sua parcimônia é que conseguimos vencer as intempéries pelas quais passamos desde o começo de nossa pesquisa. Meus sinceros agradecimentos por ter me aceito como seu orientando.

Sumário

Agradecimento.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. DIABETES.....	7
2.2. ESTRESSE OXIDATIVO.....	9
2.3. ACETILCOLINESTERASE.....	12
2.4. PLANTAS MEDICINAIS.....	12
2.5. <i>Cochlospermum regium</i>	14
2.5.1. ASPECTOS BOTÂNICOS.....	14
2.5.2. ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS.....	15
2.5.3. TOXICIDADE.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
5. ANEXOS.....	23
6. ARTIGO.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1. COLETA E PREPARAÇÃO DO VEGETAL.....	27
2.2. TEOR DOS CONSTITUINTES.....	28
2.2.1. CONCENTRAÇÃO FENÓLICOS TOTAIS.....	28
2.2.2. CONCENTRAÇÃO TOTAL DE FLAVONÓIDES.....	28
2.2.3. CONCENTRAÇÃO DE TANINO CONDENSADO (TC).....	28
2.2.4. CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOL.....	29
2.2.5. HPLC – DAD.....	29
2.3. TESTES <i>IN VITRO</i>	30
2.3.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	30
2.3.1.1. CAPTAÇÃO DO RADICAL LIVRE.....	30
2.3.1.1.1. DPPH.....	30
2.3.1.1.2. ABTS.....	30
2.3.1.2. PEROXIDAÇÃO.....	31
2.3.1.2.1. MÉTODO DE β -CAROTENO / ÁCIDO LINOLEICO.....	31
2.3.1.2.2. MALONDIALDEÍDO (MDA).....	31
2.3.2. FORMAÇÃO DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA NO SISTEMA BSA/GLICOSE.....	32
2.4. TESTES <i>EX VIVO</i>	32
2.4.1. DISSACARIDASES.....	32
2.4.2. INIBIÇÃO DA AChE EM ESTRUTURAS CEREBRAIS.....	33
2.5. TESTES <i>IN VIVO</i>	33
2.5.1. ANIMAIS.....	34
2.5.2. TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG).....	34
2.5.3. INDUÇÃO DA DIABETES COM ALOXANO.....	34
2.5.4. INIBIÇÃO DAS DISSACARIDASES.....	34
2.5.5. AVALIAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	35
2.5.6. DIETA HIPERGLICÍDICA.....	35
2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
3. RESULTADOS.....	37
3.1. TEOR DE CONSTITUINTES.....	37

3.2. ANTIOXIDANTES.....	37
3.3. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DOS AGES NO SISTEMA DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA/GLICOSE.....	38
3.4. EFEITO DO EXTRATO HIDROMETANÓLICO DE <i>C. REGIUM</i> NA ATIVIDADE DAS DISSACARIDASES.....	40
3.5. TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG).....	41
3.5.1. RESULTADOS DO TOTG.....	41
3.5.2. RESULTADOS DA DOSAGEM O GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	42
3.5.3. DOSAGEM DAS DISSACARIDASES APÓS O TOTG.....	43
3.6. ANIMAIS DIABÉTICOS.....	44
3.6.1. RESULTADOS DA DOSAGEM O GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	45
3.7. DIETA HIPERGLICÍDICA.....	45
3.7.1. TOTG DOS ANIMAIS DA DIETA HIPERGLICÍDICA.....	45
3.7.2. GLICEMIAS DE JEJUM.....	46
3.7.3. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	47
3.8. INIBIÇÃO DA AChE.....	47
4. DISCUSSÃO.....	49
5. CONCLUSÃO.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7. APROVAÇÃO DA COMISSÃO NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	61
8. REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NO <i>BIOMEDICINE AND PHARMACOTHERAPY</i>	62

RESUMO

A hiperglicemia é a principal consequência da Diabetes *Mellitus*, sendo esta uma doença de caráter multifatorial, sendo que, de forma crônica está relacionada com a formação de radicais livres, especificamente os produtos finais da glicação avançada (AGES – *Advanced glycation end products*), e com processos inflamatórios como nefropatia e neuropatia. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg., Bixaceae, é uma planta do cerrado conhecida por seu poder anti-inflamatório. Este trabalho teve por objetivo realizar a análise fitoquímica e avaliar os efeitos antioxidantes, antiglicação, antidiabéticos e anticolinesterásico do extrato hidrometanólico de raízes do *C. regium*, através de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (ratos Wistar). Foram avaliados os teores de fenólicos totais, flavonoides, taninos condensados e flavonol. A atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de DPPH, ABTS, Beta-caroteno/Ácido linoleico e malondialdeído (MDA). O teor dos constituintes majoritários foi avaliado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography). A atividade antioxidante foi investigada através dos métodos DPPH, ABTS, método de β -caroteno/ácido linoleico e malondialdeído. A inibição de AGES foi examinada através de um sistema albumina sérica bovina cujo agente glicosilante foi a glicose. Inibição das dissacaridase foi avaliada através de métodos *in vitro* e *in vivo*. Houve análise da inibição da acetilcolinesterase (Ache) em estrutura cerebrais. Foi realizado Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) em animais normoglicêmicos que receberam sobrecarga de glicose, nos animais diabéticos induzidos com aloxano e nos animais que receberam uma dieta hiperglicídica. O extrato hidrometanólico apresentou alta concentração de compostos fenólicos, flavonóides e um efeito antioxidante. A cromatografia líquida revelou uma maior concentração de ácido gálico, seguidos de menor teor de ácido caféico e ácido elágico. Houve inibição da formação de AGES significativamente. O TOTG dos animais normoglicêmicos demonstraram uma resposta significativa a uma dose de 100 mg/kg de *C. regium*, acompanhada de aumento do teor de glicogênio hepático. Houve também uma redução significativa na redução da glicemia em jejum de animais diabéticos induzida com aloxano após 7 dias de tratamento, com doses diárias de 100 mg/kg. Após 14 semanas de dieta hiperglicídica, sendo 4 de tratamento com dose de 100mg/kg, houve diminuição dos triglicerídeos. Assim, o extrato de *C. regium* apresentou efeitos promissores antioxidantes, antiglicação e antidiabéticos que podem estar relacionados ao seu alto conteúdo fenólico.

Palavras chaves: *Cochlospermum regium*, diabetes, antioxidantes, AGEs, aloxano, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Hyperglycemia is the main consequence of Diabetes *Mellitus*, which is chronic related to the formation of free radicals, specifically Advanced Glycation End Products (AGES) and inflammatory processes such as nephropathy and neuropathy. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg., Bixaceae, is a cerrado plant known for its anti-inflammatory power. The objective of this work was to analyze the contents of the constituents, to evaluate the antioxidant, antiglycation, antidiabetic and anticholinergic effects of the hydrometanolic extract of *C. regium* roots, through experimental models *in vitro* and *in vivo*. The total phenolics, flavonoids, condensed tannin and flavonol were analyzed. The content of the major constituents was evaluated through High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The antioxidant activity was investigated through the DPPH, ABTS, β -carotene / linoleic acid and malondialdehyde methods. Inhibition of AGES was examined by a bovine serum albumin system whose glycosylating

agent was glucose. Inhibition of disaccharidase was assessed by *in vitro* and *in vivo* methods. There was analysis of the inhibition of acetylcholinesterase (Ache) in brain structure. The antidiabetic potential was performed in normoglycemic animals that received glucose overload, in diabetic animals induced with alloxan and in animals that received a hyperglycemic diet. The hydromethanolic extract presented high concentration of phenolic compounds, flavonoids and an antioxidant effect. Liquid chromatography revealed a higher concentration of gallic acid followed by caffeic acid and ellagic acid. There was significantly inhibition of AGES formation. The TOTG of normoglycemic animals demonstrated a significant response at a dose of 100 mg / kg *C. regium*, accompanied by an increase in hepatic glycogen content. There was also a significant reduction in fasting glucose of alloxan-induced diabetic animals after 7 days of treatment with daily doses of 100 mg / kg. After 14 weeks of hyperglycemia diet, 4 of the treatment with a dose of 100mg / kg, there was a decrease in triglycerides. Thus, the extract of *C. regium* showed promising antioxidant, antiglycation and antidiabetic effects that may be related to its high phenolic content.

Keywords: *Cochlospermum regium*, Diabetes, Phenolic compounds, AGEs, Alloxan, acetylcholinesterase.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para cura de enfermidades remonta da mais tenra antiguidade, e sua utilização ao longo dos séculos vem sendo aperfeiçoada para que a utilização destas seja seguro e alcance o fim desejado [1].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), medicina tradicional é a integração dos conhecimentos, habilidades e práticas baseados nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, sendo explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde, prevenções, diagnóstico, tratamento de doenças físicas e mentais. E ainda os termos “medicina alternativa e/ou complementar” são mescladas como medicina tradicional em alguns países, referindo-se ao conjunto amplo de práticas de cuidados de saúde que não fazem parte da própria tradição do país e não estão integradas no sistema de cuidados de saúde dominante [2].

Já a utilização de fitoterápicos, refere-se ao uso de medicamentos à base de plantas e seu longo histórico. Seu uso é bem estabelecido e largamente reconhecido como eficaz e seguro, e pode ser aceito pelas autoridades nacionais de saúde [2, 3].

A utilização de fitoterápicos como prática alternativa para diversos tratamentos é muito utilizada em países subdesenvolvidos onde a população carente não possui acesso a medicamentos alopáticos mais onerosos, e implantação de políticas públicas que estimulem tal mecanismo é necessária. Mas não só países em desenvolvimento se utilizam de medicamentos fitoterápicos, países como Alemanha, França, Bélgica, Suécia, Suíça, Japão e Estados Unidos, enfatizam a técnica fitoterápica e onde trabalhos científicos sobre o tema são publicados [4].

Segundo dados do Portal Brasil, até o ano de 2016, o Sistema Único de Saúde (SUS), ofertava 12 medicamentos fitoterápicos que são indicados, por exemplo, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos para gastrite e úlcera e também medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite. Segundo o Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ), os fitoterápicos mais utilizados na rede pública são o guaco, a espinheira-santa e a isoflavona-de-soja, utilizados como auxiliares no tratamento de problemas respiratórios, gastrite e úlcera e sintomas do climatério, respectivamente [5].

A OMS e o Fundo das Nações Unidas para Infância (Unicef) realizaram uma Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Alma-Ata, citando a necessidade da ação imediata dos governos, profissionais das áreas de saúde, bem como a comunidade mundial para proteger e promover a saúde dos povos do mundo. Neste encontro foi recomendado aos estados membros formular políticas referentes à utilização de remédios tradicionais de eficácia comprovada e explorar as possibilidades de incorporar o conhecimento tradicional às atividades de atenção primária em saúde [6].

Ainda no final da década de 70, a OMS, cria o Programa de Medicina Tradicional que recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas que viabilizem a integração da medicina tradicional e complementar/alternativa nos sistemas nacionais de saúde e promover o uso racional dessa integração. Embora a medicina moderna seja reconhecida mundialmente, boa parte da população ainda se utiliza da medicina tradicional, principalmente países em desenvolvimento, seja dito que 80% desta população se utilizam de práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas [7].

Em 1987, a Assembleia Mundial de Saúde, reforçou as recomendações feitas pela Alma-Ata, recomendando que os estados membros além de iniciar programas relativos à medicina tradicional, assegurarem a qualidade dos medicamentos extraídos de plantas, pela utilização de técnicas modernas e utilização de padrões apropriados de boas práticas de fabricação. Ainda neste âmbito, em 1991, a OMS, reiterou a importância da medicina tradicional na prestação de assistência social, e a cooperação com a assistência sanitária moderna, principalmente no tocante ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, com a intenção de reduzir gastos com medicamentos. Sugeriu, também, que esses remédios fossem aproveitados da melhor maneira possível, e que os produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, poderiam conduzir ao descobrimento de novas substâncias terapêuticas [7].

O Brasil é o país que possui a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial. Dentre esses elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são matéria prima para manufatura de fitoterápicos e demais medicamentos. E neste intuito, com seu amplo patrimônio relacionado à biodiversidade, em consonância com as solicitações da OMS, o Brasil formulou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto N° 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelecendo diretrizes para o uso racional de plantas

medicinais e fitoterápico em nosso país, desenvolvendo tecnologias e inovações, que possam fortalecer as cadeias de arranjos produtivos, o uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde [1, 3, 7].

No ano de 1990, a Lei nº 8.080/90 instituiu que é “dever do Estado garantir a saúde através de formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos e no estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação”. No leque de atuação do SUS, a criação de políticas de medicamentos teve como escopo “garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, a promoção do uso racional e o acesso da população”. Nesse contexto houve ênfase na construção de programas para a regulamentação e utilização de fitoterápicos pela população brasileira, como exemplo temos a 8ª Conferência Nacional de Saúde, realização em 1986, que dentre suas recomendações, solicitava “a introdução de práticas alternativas de assistência à saúde”. Já em 1996, a 10ª Conferência Nacional de Saúde recomendou a incorporação, no SUS, de práticas de Saúde como fitoterapia, acupuntura e homeopatia. Ainda podemos citar mais medidas administrativas que foram tomadas pelo Ministério da Saúde para programar as diretrizes estabelecidas pelas conferências nacionais, podendo citar ainda os fóruns para discussão da Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos, em 2001, e o Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica, a 1ª Conferência Nacional de Assistência Farmacêutica e a 12ª Conferência Nacional de Saúde, em 2003 2006 [3, 7].

Essas ações deram origem em 2004 na Política Nacional de Assistência Farmacêutica (PNAF), na Política Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde (PNCTIS) e na Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Saúde (ANPPS). A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPICS), publicada em 2006 [3, 7].

Em novembro de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por intermédio da Farmacopeia Brasileira, criou o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (Resolução RDC nº 60 de 10 de novembro de 2011), principalmente voltado para as práticas de manipulação e dispensação de fitoterápicos, auxiliando os serviços de fitoterapia e Farmácias em todo país. Reforçando ainda esta ideia, em maio de 2014 através da resolução RDC nº 26, criou-se a Classe de Produto Tradicional Fitoterápico, tendo como base para sua notificação o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Trilhando ainda o mesmo

caminho a Anvisa, através de sua diretoria colegiada, em 17 de junho de 2016, RDC nº 84, aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira, sendo mais uma obra da Farmacopeia Brasileira nos esforços para construção de um fitoterapia racional [8].

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença de caráter multifatorial cuja consequência comum é a hiperglicemia. A homeostase normal da glicose é alcançada pela precisa regulação da produção e secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas. Esta homeostase também requer uma adequada resposta à insulina dos tecidos a ela sensíveis, como fígado, músculo e tecido adiposo. Uma resposta inapropriada da homeostase glicêmica pode levar ao diabetes [9-12].

Dentre as plantas do cerrado que são bastante utilizadas nos meios populares temos o *Cochlospermum regium*, muito utilizada por curandeiros por seu poder anti-inflamatório [13, 14]. Existem correspondentes da mesma família da planta supracitada, como o *Cochlopermum planchonii*, que já vem sendo avaliada por seu potencial antidiabético. Portanto nosso estudo tem por fundamento avaliar o potencial antidiabético do *Cochlospermum regium* em testes *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. DIABETES

Organizada pela OMS, a comemoração do Dia Mundial da Saúde do ano de 2016 foi sob o lema diabetes. Sendo considerada um dos maiores desafios da saúde pública, só reconhecida como epidemia pelos organismos internacionais nos finais do século XX, a diabetes esta relacionada com a combinação de fatores genéticos, comportamentais, sociais e ainda da vida intrauterina. E apesar de toda evolução científica nas últimas décadas, a sua cura, exceto para diabetes tipo I, ainda esta longe de ser alcançada. *A priori* a diabetes alcançava países ricos, mas a globalização abraçou todos os continentes, aumentando os níveis de glicemia da população em países como China, Índia, Brasil, México, Paquistão e Egito. Vários estudos confirmam que a epidemia da diabetes só poderá ser combatida com uma intervenção baseada na prevenção primária [15].

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Diabetes, atualmente estima-se que a população mundial de diabetes seja em torno de 387 milhões, podendo alcançar 471 milhões em 2035, sendo a 7ª causa de morte em 2030. Estes números podem estar sendo cada vez mais crescentes devido ao aumento do envelhecimento populacional, da progressiva prevalência da obesidade e sedentarismo, ainda com a maior sobrevida dos diabéticos [16, 17]. Cifras estabelecidas pela Federação Internacional de Diabetes (FID) em 2015 são alarmantes, estima-se que mais de meio milhão de crianças menores de 14 anos estão com diabetes do tipo I, 415 milhões de adultos entre 20-79 anos estão com diabetes no mundo, e destes últimos 193 milhões estão sem diagnóstico. Outros 318 milhões de habitantes têm tolerância à glicose alterada, e um em cada sete nascimentos se veem afetado pela diabetes gestacional, promovendo um grande risco de desenvolverem diabetes, e a previsão para 2040, se esta enfermidade não for contida, é de 642 milhões de pessoas vivendo com esta enfermidade [18]. Já na América do sul e central estima-se que 29,6 milhões de pessoas estejam com diabetes em 2015, com estimativa de 48,8 milhões em 2040 [18]. No Brasil em 2014, estimou 11,9 milhões de pessoas com diabetes na faixa entre 20 e 79 anos, podendo alcançar 11,9 milhões em 2035 [18].

A DM e suas complicações são uma das principais causas de mortes na maioria dos países [18]. A Diabetes *mellitus* tipo II (DMII) é a mais comum, e tem aumentado junto com as

mudanças sociais e culturais [16, 18]. Em países de alta renda 91% de adultos com DM tem a tipo II [18].

O DM é uma consequência da secreção inapropriada de insulina pelas células beta pancreáticas, defeitos na ação da insulina e/ou associação desses dois distúrbios. É uma doença com etiologia heterogênea relacionada a distúrbios metabólicos crônicos, acompanhada de hiperglicemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Frequentemente ao longo de vários anos, diversas complicações teciduais surgem como a nefropatia, neuropatia e a retinopatia. A disfunção do endotélio vascular é um evento crítico e precoce, podendo levar a alterações dos vasos sanguíneos de grande e pequeno calibre, macroangiopatia e microangiopatia respectivamente. Estas últimas podem se manifestar clinicamente como doença arterial coronariana, doença cerebrovascular ou doença vascular periférica [12, 19, 20].

A fisiopatologia da DM está relacionada com o metabolismo dos carboidratos e da ação da insulina. Os carboidratos presente nos alimentos são quebrados no intestino em moléculas menores, por enzimas intestinais as glicosidases (dissacaridases), para que possam ser absorvidos, levados a corrente sanguínea e finalmente utilizados pelas células. A insulina, produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, se liga a receptores celulares específicos desencadeando uma série de reações que facilitam a entrada de glicose, que por sua vez e utilizada como fonte de energia. O aumento da liberação de insulina, aumenta o consumo de glicose pela célula e diminui a quantidade glicose intravascular. Um dos mecanismos que levam a diminuição da glicemia é a captação da glicose pelas células, principalmente pelo músculo esquelético e células hepáticas, levando a formação de glicogênio pela gliconeogênese. Se a dinâmica de produção e liberação de insulina se modificarem, subsequentemente a da glicemia também irá modificar. A utilização inadequada da insulina pela célula também leva a alterações no nível da glicemia [21, 22].

Diabetes *mellitus* tipo I (DMI) comumente se desenvolve em crianças e evolui com a idade. É uma doença que possui um caráter autoimune, onde há destruição das células β pancreáticas, tornando estes indivíduos insulino-dependentes. Embora o início seja abrupto, a doença surge de um ataque autoimune crônico que atua durante anos antes do distúrbio se tornar evidente, com características clínicas de hiperglicemia e cetose. A presença do componente genético na DMI envolve a herança de múltiplos genes conferindo susceptibilidade ao transtorno

[21, 23]. Fatores ambientais também desempenham papel na patogênese da DM. Estudos epidemiológicos sugerem também a influência de vírus na DMI [16, 21, 22].

Diabetes *mellitus* tipo II anteriormente denominada de DM não insulino-dependente, tem um início tardio e compreende de 90 a 95% dos casos. Os dois defeitos que mais a caracterizam são a resistência à insulina e a secreção inadequada de insulina. Possui uma patogênese mais heterogênea e complexa e caracteriza-se por um início lento, gradual e muitas vezes assintomático. Defeitos genéticos, hereditariedade e fatores ambientais desempenham um papel no desenvolvimento da doença, mas o estilo de vida contemporâneo ajuda em muito no desencadear da patologia. [16, 21, 22, 24].

Já a diabetes Gestacional evidencia-se por qualquer intolerância à glicose de grau variado, com início ou diagnóstico durante a gestação. Ocorre reversão para tolerância normal na maioria dos casos após a gestação, porém a riscos de 10 a 63% de desenvolvimentos de DMII em 5 a 16 anos após a gravidez [16].

Em um grupo estão sediadas outros tipos de DM, onde as alterações ou processos patológicos causadores podem ser identificados. A manifestação clínica deste grupo é bastante variada e pertencem a esta categoria defeitos genéticos na ação da insulina, doenças no pâncreas exócrino e outras condições como endocrinopatias e DM induzida por medicamentos e/ou agentes químicos [16].

2.2. ESTRESSE OXIDATIVO

Considerando a hiperglicemia tem sido marcada como o fator principal das complicações relacionadas ao DM, torna-se necessário a compreensão de sua patogênese e de mecanismo moleculares subjacentes, assim como, os principais fatores de risco para prevenção e terapia de tal injúria orgânica. A este respeito, pesquisas relatam que o estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento do DMII. Radicais livres derivados do oxigênio, a proteína quinase C e produtos não enzimáticos da glicose e da albumina, denominados produtos finais da glicação avançada AGEs (do inglês *advanced glycation end products*), têm sido associado a essa disfunção [19, 25].

A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) é um subproduto inevitável do metabolismo. A principal fonte de ROS em células de mamíferos é advinda da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Devido ao ambiente celular altamente reduzido, potentes sistemas antioxidantes são necessários para captação de ROS ou transformação dos mesmos em produtos menos reativos [25-27]. Essas espécies reativas de oxigênio possuem elétrons desemparelhados em sua última camada de valência, conferindo-lhes a capacidade de atacar biomoléculas, como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, acarretando e/ou contribuindo para processos patológicos como disfunção cerebral e diabetes. Frente ao estresse oxidativo a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, a qual leva a alterações na sua estrutura e permeabilidade [26, 27].

O estresse oxidativo está sendo cada vez mais reconhecido como um dos complicadores do processo diabético. Ele está relacionado à ativação da via do poliol, da formação de AGEs e a subsequente formação de espécies reativas de oxigênio. E no desequilíbrio do sistema antioxidante natural, o aumento do stress oxidativo caminha para ativação de vias sinalização intracelular sensíveis com consequentes danos celulares [28].

Entre os vários mecanismos fisiopatológicos, umas das consequências do estresse oxidativo é lipoperoxidação [29]. A lipoperoxidação é o processo pelo qual as espécies reativas de oxigênio atacam ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, permitindo a entrada daqueles de forma intracelular, provocando ações deletérias como ruptura das membranas celulares, mutações no DNA, oxidação dos lipídeos insaturados e outros. É importante salientar que os lipídeos desempenham papel fundamental na alimentação, não só pelo fornecimento de energia, mas também como transportadores de vitaminas lipossolúveis, por exemplo. Devido as ações fisiológicas e deletérias dos processos oxidativos, como a lipoperoxidação, a existência de substâncias que inibam a oxidação poderá auxiliar no controle dos processos oxidativos em organismos vivos [30].

Entre as mais variadas mudanças funcionais relacionadas à idade e ao diabetes que afetam os tecidos humanos, há um aumento nas taxas de lesão tecidual com capacidade de cura relativamente baixa. E embora os motivos sejam heterogêneos, o aumento de reações não enzimáticas dentro da família dos AGEs que desempenham cada vez mais esse papel [31]. Os AGEs constituem uma gama variada de moléculas formadas a partir de interações

aminocarbonila, de natureza não enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, ácidos nucleicos ou aminofosfolipídeos. A reação de Maillard inicia com a formação da base Schiff instável formada pela condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor, juntamente com um grupamento amina, principalmente a lisina e arginina. A base de Schiff sofre rearranjos, formando uma estrutura mais estável, chamado produtos de Amadori. A hemoglobina glicosilada e a frutossamina são exemplos de produtos de Amadori. *In vivo*, a formação destes últimos pode ocorrer em um período de dias e, uma vez gerado, é praticamente irreversível. Os produtos de Amadori formados possuem ainda grupamentos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários acessíveis, originando os produtos avançados da reação de Maillard. As consequências patológicas causada pelos AGEs estão relacionadas à capacidade que estes compostos possuem em alterar as propriedades químicas e funcionais das mais variadas estruturas biológicas, produzindo radicais livres, formando ligações cruzadas com proteínas e interações com receptores celulares [32-35].

O sistema de defesa antioxidante celular desempenha um papel importante contra o estresse oxidativo, principalmente na diabetes. Um dos mecanismos pelo qual o estresse oxidativo causa danos na diabetes e pela ativação da via do poliol levando a formação de AGEs. O poliol consiste em duas enzimas. A primeira enzima é a aldose redutase (AR), que reduz a glicose ao sorbitol com ajuda do fator NADPH, e a segunda enzima, o sorbitol desidrogenase (SDH), com seu cofator NAD, convertendo do sorbitol em frutose. A acumulação de sorbitol e frutose estimulam a formação de AGEs, e a acumulação de sorbitol leva a um inchaço osmótico, alterações na permeabilidade da membrana e no estresse oxidativo. Supressão do metabolismo da glicose através da via do poliol pela inibição da AR é uma forma potencial de prevenir complicações secundárias na diabetes. O envolvimento da via poliólica e o estresse oxidativo na etiologia das complicações diabéticas requer a inibição de ambos os processos. Assim sendo, compostos bifuncionais com atividade antioxidante e de inibição da aldose redutase em comum seria dualmente benéfica. Várias plantas com rica fonte de flavonóides foram estudadas para a atividade inibitória da aldose redutase. Há um grande interesse em desenvolver antioxidantes naturais, por exemplo, polifenóis, presentes em plantas medicinais e dietéticas, que poderiam ajudar na prevenção do dano oxidativo. Certas plantas de ervas relataram ter tanto atividades inibitórias da aldose-redutase quanto as atividades antioxidantes, possuindo assim um valor terapêutico melhor do que outros tratamentos para superação do diabetes mellitus [36].

2.3 ACETILCOLINESTERASE

Um dos neurotransmissores excitatórios mais estudados relacionados ao sistema nervoso central (SNC) e no sistema periférico (SNP) é a acetilcolina (Ach), sendo sintetizada a partir da acetil coenzima A (acetil CoA), com sua formação durante a respiração celular e da colina, um produto importante do metabolismo dos lipídeos. A Ach desempenha funções importantes no SNC e tem sido associada com as funções cognitivas, processamento de informações sensoriais, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral. A enzima que desempenha o papel de degradação da acetilcolina, catalisando a hidrólise do substrato Ach em ácido acético e colina é a acetilcolinesterase (AChE), uma serina hidrolase que desempenha papel importante no mecanismo colinérgico. A AChE é encontrada, principalmente nas sinapses do SNC, SNP parassimpático e junção neuromuscular. A função da AChE é de regulação da transmissão dos impulsos nervosos através das sinapses colinérgicas pela hidrólise do neurotransmissor excitatório Ach, terminando sua ação [37-39].

A doença de Alzheimer (DA) é uma demência degenerativa progressiva com acentuada preocupação social. Ao redor do mundo estima-se que 40 milhões de pessoas apresentem algum tipo de demência e dentre estas 25 milhões podem apresentar sintomas característicos da DA. A estratégia em uso para tratamento de pacientes com DA é a terapia colinérgica, que consiste no uso de fármacos com ação inibitória à acetilcolinesterase (AChE) para impedir a diminuição da concentração no neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas, que é escassa nas regiões neuronais do córtex cerebral de pessoas com DA [40].

2.4 PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de plantas medicinais para fins curativos é descrita desde a mais tenra história de nossa humanidade, sendo uma das formas mais antigas de prática medicinal [41]. Planta medicinal é um termo genérico utilizado para plantas com propriedades terapêuticas. E segundo a OMS, 80% da população principalmente em países subdesenvolvidos se utilizam destes recursos, principalmente porque elas são largamente cultivadas e de fácil acesso [42].

Dentre as famílias com mais espécies catalogadas em questionários etnofarmacológicos, com plantas utilizadas para diabetes na América Central, realizadas por Giovannini et al, 2016,

temos a Asteraceae (7 espécies), Fabaceae (7 espécies), Rubiaceae (6 espécies), Euphorbiaceae (6 espécies), Bignoniaceae (5 espécies), Myrtaceae (5 espécies), Rutaceae (5 espécies), Amaranthaceae (4 espécies), e Solanaceae (3 espécies). Muitas das classes fitoquímicas que ocorrem nestas famílias podem contribuir para o conhecimento e relevância da utilização destas plantas na diabetes. Este mesmo grupo de trabalho fez um levantamento de que 656 plantas com floração utilizadas para diabetes, uma alta proporção de 437 gêneros, representando 111 famílias, eram das asterídeas e rosídeas. Há uma diversidade química reportada entre as rosídeas e membros da Fabaceae, incluindo flavonoides, alcaloides e saponinas triterpênicas. Reportaram ainda 81 espécies dentro da Fabaceae com atividade hipoglicêmica. O mesmo grupo ainda estimou que 50% dos produtos naturais derivados de plantas que são farmacologicamente ou biologicamente significativos são alcaloides, e ainda dentro das Fabaceae e da Rubiaceae também existem muitas espécies contendo alcaloides. Membros da Solanaceae contem uma larga classe de alcaloides biologicamente ativos, incluindo, tropanos, pirrolidina, glicoalcaloides, e alcaloides esteroidais. Membros das Euphorbiaceae também contem alcaloides, incluindo a classe dos tropanos, em adição aos diterpenos e polifenóis. Sendo esta última classe ligada a efeitos benéficos na utilização para diabetes, reduzindo a absorção dos carboidratos da dieta, regulando o metabolismo dos carboidratos e estimulando a secreção da insulina. Membros da Asteraceae são reportados por conter poliacetilenos, sesquiterpenos, monoterpenos, diterpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Triterpenos de várias espécies tem sido associado com relevantes efeitos sobre a diabetes [17].

Populações de países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais para o tratamento da diabetes devido ao seu baixo custo e de seus poucos efeitos colaterais, Arumugam *et al* e Sunil *et al* estudaram plantas com potencial efeito antidiabético, dentre as quais temos plantas da família Leguminosae, Liliaceae, Rutaceae, Meliaceae e outras [22, 43]. Em um levantamento realizado por Trojan-Rodrigues *et al*, citando Cazarolli *et al*, 2009, o composto Kaempferol, extraído da *Bauhinia Fotificata*, possui efeitos antioxidante e mimético à insulina [44].

2.5 *Cochlospermum regium*

Muitas plantas são utilizadas há tempos na história da humanidade para tratamentos das mais diversas doenças. A organização mundial de saúde estima que 80% da população se utilizam da medicina tradicional para o tratamento de doenças em processos patológicos primários [22]. A espécie *Cochlospermum regium* (Mart. & Schrank) Pilger é uma planta popularmente conhecida como algodãozinho do campo, é de ocorrência comum no bioma do cerrado, caatinga e pantanal, das regiões Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, e tem sido muito reportado por vários usos medicinais como: anti-inflamatório, distúrbios gastrointestinais, abscessos, febres e icterícia [45-47].

2.5.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

Cochlospermum regium (Schrank) Pilg., conhecida popularmente como algodãozinho do campo, é uma espécie bastante conhecida no cerrado. O gênero *Cochlospermum* Kunth. integra a família Bixaceae Kunth (Classe Equisetopsida, Subclasse Magnoliidae Novák ex Takht.) [48] [49]. Sua existência é relatada em regiões quentes e secas das Américas, África, Austrália, Paraguai e Bolívia. No Brasil, ela é comumente encontrada nas regiões do cerrado nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Bahia, Paraná, Pernambuco, Ceará e ainda na Amazônia [50].

A *C. regium* é considerada uma planta forrageira, ornamental e muito utilizada para fins na medicina tradicional. Dados etnofarmacológicos remontam o uso das raízes do *C. regium* nas regiões do cerrado, onde é conhecida também como algodãozinho-do-cerrado, algodãozinho, algodão-cravo, algodão-do-mato, algodoeiro-do-campo, butuá-de-corvo, pacote e periquiteira-do-campo. A utilização para fins na medicina tradicional são relacionadas diferentes enfermidades como inflamações crônicas (artrite, reumatismo e acne), infecções, geralmente envolvendo alterações urogenitais (leucorréia, gonorreia) e ainda como banho de acento [14].

O *C. regium* é uma espécie arbustiva com caule nodoso de lenho leve, com sistema subterrâneo bem desenvolvido, com raiz axial profunda e carnosa que pode atingir mais de 3 metros de comprimento. Possuem folhas com um verde escuro, opacas, alternas, de pecíolos longos, palmatífidas e profundamente lobadas. Seus ramos variam entre 0,8 e 1,8 metros de

comprimento. As flores ígneo-fulvas ou amarelas, em forma de concha, podem medir de 6 a 8 cm de diâmetro dispostas em panículas terminais, contendo de 5 a 10 flores. Já o fruto é uma cápsula deiscente ovoide ou elipsoide com cerca de cm de comprimento, tendo sementes envoltas em filamentos compridos e lanosos [51, 52].

2.5.2 ASPECTOS QUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS

Santos et al, 2015, realizando a análise fitoquímica do *Cochlospermum regium* encontraram na planta os compostos fenólicos flavonóides e taninos, além de saponinas [53].

Nos ensaios fitoquímicos tradicionais realizados por via úmida descrevem que a raiz de *C. regium* possui taninos e outros compostos fenólicos, mucilagens, saponinas, esteróides, triterpenos e flavonóides. Desta última classe houve o isolamento do kaempferol, naringenina, aromdendrina e diidrokaempferol-3-O- β -glicopiranosídeo [45, 46].

Solon, 2009 em um estudo sobre análise fitoquímica e farmacognóstica da raiz do *Cochlospermum regium*, durante o fracionamento químico isolou ácido elágico, ácido gálico, diidrokamepferol-3-O- β -glicopiranosídeo [45].

O extrato de partes do *C. regium* é muito utilizado popularmente por suas atividades anti-inflamatórias, com em banho de assento de garrafadas [14]

2.5.3 TOXICIDADE

Em estudo de toxicidade aguda e subaguda realizada por Toledo et al, 2000, perceberam que mesmo com uma dose oral de 5g/Kg de peso corporal não havia mortalidade entre ratos, de forma aguda, não encontrando também alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e hematológicos quando administrados oralmente de forma subaguda, demonstrando que o *C. regium*, quando administrados de forma oral, tanto de forma aguda e subaguda possuem baixa toxicidade [54].

Inácio, 2010 em um estudo agrônomico e químico do *Cochlospermum regium* demonstrou a baixa toxicidade desta planta no teste realizado com 3T3 fibroblastos [55].

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi fazer a avaliação fitoquímica, analisar o potencial antidiabético, antioxidante e antiglicação de raízes da espécie *Cochlospermum regium* com testes *in vitro* e *in vivo*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de constituintes no extrato das raízes do *C. regium*;
- Avaliar a atividade antioxidante através do método de captação de radicais livres DPPH, ABTS, método de método de β -caroteno / ácido linoleico, e MDA.
- Caracterizar o potencial inibitório do extrato de *C. regium* na formação de AGES através do modelo BSA/Glicose.
- Avaliar a potencial atividade inibidora das dissacaridases do extrato da raiz do *C. regium* através de ensaios *in vitro* e *in vivo*;
- Verificar o efeito extrato hidrometanólico de *C. regium* na glicemia de animais normoglicêmicos, hiperglicêmicos e diabéticos por um período agudo e crônico de tratamento por via oral;
- Estudar o efeito do extrato hidroalcoólico no conteúdo de glicogênio hepático em ratos normoglicêmicos, hiperglicêmicos e diabéticos;
- Avaliar o efeito anticolinesterásico do extrato hidrometanólico das raízes do *C. regium*.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M.K.C.T., 2002. Bixaceae. Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo 2, 55-56.
- Adisakwattana, S., Thilavech, T., Sompong, W., Pasukamonset, P., 2017. Interaction between ascorbic acid and gallic acid in a model of fructose-mediated protein glycation and oxidation. *Electronic Journal of Biotechnology* 27, 32-36.
- Andréia Maria Zanoelo, C.M.-M., Jéssica Kerpel Gindri, Andreane Filappi, Danívia Prestes e Marcelo Cecim, 2002. Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes Mellitus induzidos por Aloxano em Ratos. *Acta Farm. Bonaerense* 21.
- Antunes, M.N., 2009. Constituintes Químicos de *Cochlospermum regium* (Martins e Schrank) Pilger (Bixaceae), Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, oferecido em associação entre a Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis. Universidade Católica de Goiás.
- Antunes, M.V., Lazzaretti, C., Gamaro, G.D., Linden, R., 2008. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 44, 279-287.
- ANVISA, A.N.D.V.S., 2016. Memento Fitoterápico Farmacopeia Brasileira. Brasília.
- ARUMUGAM, G., MANJULA, P., PAARI, N., 2013. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease* 2(3), 196-200.
- Aster, V.K.A.K.A.N.F.J.C., 2010. *Patologia Bases Patológicas das Doenças*, 8ª ed, Rio de Janeiro.
- AZEVEDO, P.S., DUARTE, D.R., MINICUCCI, M.F., MATSUBARA, B.B., MATSUBARA, L.S., NOVO, R., NOVELLI, E.L., CAMPANA, Á.O., PAIVA, S.A.R., ZORNOFF, L.A.M., 2009. Papel da lipoperoxidação na intensificação da remodelação causada pelo betacaroteno após o infarto. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 93, 34-38.
- Bahmani, M., Golshahi, H., Saki, K., Rafieian-Kopaei, M., Delfan, B., Mohammadi, T., 2014. Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, Supplement 2, S687-S692.
- Barbosa, J.H.P.O., Suzana Lima de; Seara Luci Tojal 2009. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. *Brazilian Journal of Nutrition* 22, 113-124.
- BOAVIDA, J.M., 2016. Diabetes: uma emergência de saúde pública e de políticas da saúde. *Revista Portuguesa de Saúde Pública* 34(1), 1-2.
- BRASIL, M.D.S.-M.-. 2006. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília.
- BRASIL, M.D.S.P., 2016. Ministério da Saúde destina mais de R\$ 1 milhão a projetos com plantas medicinais. (Accessed 13 - Abril 2017).
- BROINIZI, P.R.B., ANDRADE-WARTHA, E.R.S.D., SILVA, A.M.D.O., TORRES, R.P., AZEREDO, H.M.C., ALVES, R.E., MANCINI-FILHO, J., 2008. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(4), 773-781.
- CAMILO, J., 2008. Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank.). Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Cho, H., 2013. Chapter Seventeen - Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Obesity, in: Gerald, L. (Ed.) *Vitamins & Hormones*. Academic Press, pp. 405-424.
- CRUZ, E.C., ANDRADE-CETTO, A., 2015. Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type 2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala. *Journal of Ethnopharmacology* 159, 238-244.

- DOS SANTOS, K.T.J., SILVA, W.C., TORQUATO, H.F.V., SELHORST, A.M., BESERRA, S., DOS SANTOS, R.A.N., DA SILVA JUNIOR, I.F., 2015. Abordagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Cochlospermum regium* em Diferentes Metodologias (Bioautografia, Disco-Difusão e Microdiluição). UNICIÊNCIAS 16(1).
- Federiuk, I.F., Casey, H.M., Quinn, M.J., Wood, M.D., Ward, W.K., 2004. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comparative medicine* 54(3), 252-257.
- FID, I.D.F.-. 2015. Atlas de la Diabetes de la FID. Bruxelas - Bélgica.
- Gandhi, G.R., Jothi, G., Antony, P.J., Balakrishna, K., Paulraj, M.G., Ignacimuthu, S., Stalin, A., Al-Dhabi, N.A., 2014. Gallic acid attenuates high-fat diet fed-streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR γ in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway. *European Journal of Pharmacology* 745, 201-216.
- GAUTIERI, A., PASSINI, F.S., SILVÁN, U., GUIZAR-SICAÍROS, M., CARIMATI, G., VOLPI, P., MORETTI, M., SCHOENHUBER, H., REDAELLI, A., BERLI, M., SNEDEKER, J.G., 2017. Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue. *Matrix Biology*.
- GIOVANNINI, P., HOWES, M.-J.R., EDWARDS, S.E., 2016. Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 184, 58-71.
- GOLDIN, A., BECKMAN, J.A., SCHMIDT, A.M., CREAGER, M.A., 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114(6), 597-605.
- Guo, Z., Niu, X., Xiao, T., Lu, J., Li, W., Zhao, Y., 2015. Chemical profile and inhibition of α -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activities by flavonoids from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Journal of Functional Foods* 14, 324-336.
- Gupta, D., Gupta, R.K., 2011. Bioprotective properties of Dragon's blood resin: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11(1), 13.
- GUPTA, P., JAIN, V., PAREEK, A., KUMARI, P., SINGH, R., AGARWAL, P., SHARMA, V., 2016. Evaluation of effect of alcoholic extract of heartwood of *Pterocarpus marsupium* on in vitro antioxidant, anti-glycation, sorbitol accumulation and inhibition of aldose reductase activity. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*.
- H. P. RANG, M.M.D., J. M. RITTER, R. J. FLOWER, 2008. Rang e Dale Farmacologia, 6 ed, Rio de Janeiro.
- Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International journal of molecular sciences* 11(4), 1365-1402.
- HENDERSON, H.P.R.J.M.R.R.J.F.G., 2016. Rang & Dale, Farmacologia, 8ª ed, Rio de Janeiro.
- Huang, D.-W., Chang, W.-C., Wu, J.S.-B., Shih, R.-W., Shen, S.-C., 2016. Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet. *Nutrition Research* 36(2), 150-160.
- INÁCIO, M.C., 2010. Estudo agrônomo, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (mart. ex. Scharank): uma planta medicinal do Cerrado.
- JAMILE FABBRIN GONÇALVES, C.M.M., ALEXSSANDRO, GEFERSON BECKER, ROSILENE RODRIGUEZ KAIZER, VANESSA BATTISTI, MAÍSA DE CARVALHO CORRÊA, PAULA ACOSTA MALDONADO, ROBERTA SCHMATZ, GUSTAVO ROBERTO THOMÉ, VERA MARIA MORSCH, MARIA ROSA CHITOLINA Schetinger., 2012. Oral administration of N-acetylcysteine improves biochemical parameters in diabetic rats. *Ciência e Natura UFSM* 34, 81-105.
- Jiang, X., Zhang, P., Li, S., Tan, X., Hu, Z., Deng, B., Wang, K., Li, C., Sullivan, M.A., Li, E., Gilbert, R.G., 2016. Molecular-size dependence of glycogen enzymatic degradation and its importance for diabetes. *European Polymer Journal* 82, 175-180.

- Jimoh, T.O., 2017. Enzymes inhibitory and radical scavenging potentials of two selected tropical vegetable (*Moringa oleifera* and *Telfairia occidentalis*) leaves relevant to type 2 diabetes mellitus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
- JOGLEKAR, M.M., BAVKAR, L.N., SISTLA, S., ARVINDEKAR, A.U., 2017. Effective inhibition of protein glycation by combinatorial usage of limonene and aminoguanidine through differential and synergistic mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules* 99, 563-569.
- Jongkees, S.A.K., Caner, S., Tysoe, C., Brayer, G.D., Withers, S.G., Suga, H., 2017. Rapid Discovery of Potent and Selective Glycosidase-Inhibiting De Novo Peptides. *Cell Chemical Biology* 24(3), 381-390.
- Kapoor, C.K.H.C., 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Journal of Food Science and Technology* 37, 153-161.
- Kappel, V.D., Cazarolli, L.H., Pereira, D.F., Postal, B.G., Madoglio, F.A., Buss, Z.D.S., Reginatto, F.H., Silva, F.R.M.B., 2013. Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23, 706-715.
- Karimi-Khouzani, O., Heidarian, E., Amini, S.A., 2017. Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats. *Pharmacological Reports* 69(4), 830-835.
- Kasture, V.M., Kalamkar, N.B., Nair, R.J., Joshi, R.S., Sabharwal, S.G., Dhavale, D.D., 2015. Synthesis, conformational study, glycosidase inhibitory activity and molecular docking studies of dihydroxylated 4- and 5-amino-iminosugars. *Carbohydrate Research* 408, 25-32.
- Kazeem, M.I., Ashafa, A.O.T., 2015. In-vitro antioxidant and antidiabetic potentials of *Dianthus basuticus* Burt & Davy whole plant extracts. *Journal of Herbal Medicine* 5(3), 158-164.
- Kim, K.M., Lee, K.-S., Lee, G.Y., Jin, H., Durrance, E.S., Park, H.S., Choi, S.H., Park, K.S., Kim, Y.-B., Jang, H.C., Lim, S., 2015. Anti-diabetic efficacy of KICG1338, a novel glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, and its molecular characterization in animal models of type 2 diabetes and insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology* 409, 1-10.
- Kirizawa, M., 1981. Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger-Cochlospermaceae.
- KUMAR, S., SINGH, R., VASUDEVA, N., SHARMA, S., 2012. Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents. *Cardiovascular Diabetology* 11, 9-9.
- Kyriakis, E., Stravodimos, G.A., Kantsadi, A.L., Chatzileontiadou, D.S.M., Skamnaki, V.T., Leonidas, D.D., 2015. Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b. *FEBS Letters* 589(15), 1787-1794.
- LIN, J.-Y., TANG, C.-Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry* 101(1), 140-147.
- Lopes, A.C., 2012. *Tratado de Clínica Médica*, 2ª ed, São Paulo.
- LUEVANO-CONTRERAS, C., CHAPMAN-NOVAKOFSKI, K., 2010. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients* 2(12), 1247-1265.
- Madani, Z., Malaisse, W.J., Ait-Yahia, D., 2015. A comparison between the impact of two types of dietary protein on brain glucose concentrations and oxidative stress in high fructose-induced metabolic syndrome rats. *Biomedical reports* 3(5), 731-735.
- Maria do Socorro, M.R., Ricardo Elesbão Alves, Edy Sousa de Brito, Selene Maia De Moraes, Caroline de Goes Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Diego Saura-Calixto, 2007. Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. *Embrapa Agroindústria Tropical/Comunicado Técnico* 4.
- Matsuchita, H.L.P., Matsuchita, A.S.P., 2015. A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública. *UNICIÊNCIAS* 19(1).

- MAXSON, E.D.R., L.W., 1972. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem.* 49, 719-729.
- MAZZANTI, C.M., SCHOSSLER, D.R., FILAPPI, A., PRESTES, D., SILVA, A.C., CORREA, M., SCHETINGER, M.R.C., MORSCH, V.M., LUNKES, G., GONZAGA, W.D.A., CECIM, M., 2004. Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos. *Ciência Rural* 34, 803-807.
- MEDA, A., LAMIEN, C.E., ROMITO, M., MILLOGO, J., NACOULMA, O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* 91(3), 571-577.
- Mehta, V., Verma, P., Sharma, N., Sharma, A., Thakur, A., Malairaman, U., 2017. Quercetin, ascorbic acid, caffeine and ellagic acid are more efficient than rosiglitazone, metformin and glimepiride in interfering with pathways leading to the development of neurological complications associated with diabetes: A comparative in-vitro study. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 55(1), 115-121.
- NADERALI, E.K., BROWN, M.J., PICKAVANCE, L.C., WILDING, J.P., DOYLE, P.J., WILLIAMS, G., 2001. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clinical science (London, England : 1979)* 101(5), 499-506.
- Nankar, R.P., Doble, M., 2017. Hybrid drug combination: Anti-diabetic treatment of type 2 diabetic Wistar rats with combination of ellagic acid and pioglitazone. *Phytomedicine* 37, 4-9.
- NASCIMENTO, É.C.M., 2009. Determinação teórica de propriedades relevantes para a atividade de inibidor da acetilcolinesterase.
- Negri, M.L.S., Possamai, J.C., Nakashima, T., 2009. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 553-556.
- NETO, M.S., 2009. Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Antipirética do Extrato Hidroalcoólico Bruto de *Cochlospermum Regium* (Mart & Schrank) Pilger em Ratos, Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, oferecido numa associação entre a Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis. Universidade Católica de Goiás, Goiás.
- NETO, M.S., 2009. Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Antipirética do Extrato Hidroalcoólico Bruto de *Cochlospermum Regium* (Mart & Schrank) Pilger Em Ratos., Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica. Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis, Goiânia.
- Nowotny, K., Jung, T., Hohn, A., Weber, D., Grune, T., 2015. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules* 5(1), 194-222.
- Oboh, G., Ogunsuyi, O.B., Ogunbadejo, M.D., Adefegha, S.A., 2016. Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *Journal of Food and Drug Analysis* 24(3), 627-634.
- PELLEGRINI, N.R., ROBERTA; PROTEGGENTE, ANNA; PANNALA, ANANTH; YANG, MIN; RICE-EVANS, CATHERINE, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10), 1231-1237.
- Pilger, R.K.F., 1924. in: Berlim-Dahlem, N.d.B.G.u.M.z. (Ed.). Berlim.
- PINTO, V.F.V.J.A.C., 2005. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? *Quimica Nova* 28.
- Punithavathi, V.R., Prince, P.S.M., Kumar, R., Selvakumari, J., 2011. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *European Journal of Pharmacology* 650(1), 465-471.
- RAMZI S. COTRAM, V.K., TUCKER COLLINS, 2000. *Patologia Estrutural e Funcional*, Rio de Janeiro.
- Ren, H., Xu, Q.-L., Zhang, M., Dong, L.-M., Zhang, Q., Luo, B., Luo, Q.-W., Tan, J.-W., 2017. Bioactive caffeic acid derivatives from *Wedelia trilobata*. *Phytochemistry Letters* 19, 18-22.

- Rolffy Ortiz - Andrade, M.T.-P., Juan Carlos Sánchez-Salgado, Sara García-Jiménez, Rafael Villalobos-Molina, Maximiliano Ibarra-Barajas, Itzell Gallardo - Ortiz E Samuel, Estrada-Soto, 2009. Acute and Sub-Chronic Effects Of *Cochlospermum vitifolium* In Blood Glucose Levels In Normoglycemic And Stz-Nicotinamide-Induced Diabetic Rats. Revista Latinoamericana de Química 37.
- Sánchez-Salgado, J.C., Ortiz-Andrade, R.R., Aguirre-Crespo, F., Vergara-Galicia, J., León-Rivera, I., Montes, S., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S., 2007. Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome. Journal of Ethnopharmacology 109(3), 400-405.
- Santos Neto, M., 2009. Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Antipirética do Extrato Hidroalcoólico Bruto de *Cochlospermum Regium* (Mart & Schrank) Pilger Em Ratos.
- SANTOS, R.L., GUIMARAES, G.P., NOBRE, M.S.D.C., PORTELA, A.D.S., 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 13(4), 486-491.
- SBD, S.B.D.D., 2015-2016. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.
- SHOBACK, D.G.G.D., 2011. Endocrinologia Básica e Clínica de Greenspan, 9ª ed, Porto Alegre.
- Siqueira, S.S.L.F.G.B.J.M.d., 2009. O Gênero *Cochlospermum* Kunth com Ênfase nos Aspectos Etnobotânicos, Farmacológicos, Toxicológicos e Químicos de *Cochlospermum Regium* (Mart. Et. Schr.) Pilger. Revista Brasileira de Farmácia 6 (3), 24.
- Sólón, S., 2009. Análises fitoquímica e farmacognóstica da raiz de *Cochlospermum reigum* (Mart. et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae., Program de de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. Universidade de Brasília, Brasília.
- Souza., E.A.L.S.J.V.D.A.T.D.d.L.E.L.d.P.Z.N.M.L.C.B.I.d., 2014. AS PLANTAS MEDICINAIS E AS LEIS NA SAÚDE PÚBLICA, Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade.
- STOCKS J, G.J., SHARP RJ, ET AL., 1974. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. Clin Scien Mol Med 47, 215-222.
- SURYA, S., SALAM, A.D., TOMY, D.V., CARLA, B., KUMAR, R.A., SUNIL, C., 2014. Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 4(5), 337-347.
- Taghzouti, H., Goumain, S., Harakat, D., Portella, C., Behr, J.-B., Plantier-Royon, R., 2015. Synthesis of 2-carboxymethyl polyhydroxyazepanes and their evaluation as glycosidase inhibitors. Bioorganic Chemistry 58, 11-17.
- TODD, J.A., WICKER, L.S., Genetic Protection from the Inflammatory Disease Type 1 Diabetes in Humans and Animal Models. Immunity 15(3), 387-395.
- Toledo, M.I., Siqueira, J.M., Araujo, L.C., Oga, S., 2000. Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) pilger. Phytotherapy research : PTR 14(5), 359-361.
- TROJAN-RODRIGUES, M., ALVES, T.L.S., SOARES, G.L.G., RITTER, M.R., 2012. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. Journal of Ethnopharmacology 139(1), 155-163.
- TROPICOS.ORG, M.B.G., 2017. (Accessed 14 e abril 2017).
- Tvete Inngjerdigen, K., Ballo, N.g., Zhang, B.-Z., Malterud, K.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Smestad Paulsen, B., 2013. A comparison of bioactive aqueous extracts and polysaccharide fractions from roots of wild and cultivated *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. Phytochemistry 93, 136-143.
- UNICEF**, 1979. Cuidados Primários de Saúde-Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde-Alma-Ata, 1978. Brasília: UNICEF.
- Wang, Y., Wang, J., Zhao, Y., Hu, S., Shi, D., Xue, C., 2016. Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4. Journal of Bioscience and Bioengineering 121(1), 36-42.
- WHO, W.H.O.-. 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva.

Yakubu, M.T., Akanji, M.A., Nafiu, M.O., 2010. Article original Pharmacology Anti-diabetic activity of aqueous extract of *Cochlospermum planchonii* root in alloxan-induced diabetic rats. Cameroon Journal of Experimental Biology 6(02), 91-100.

Yin, P., Yang, L., Xue, Q., Yu, M., Yao, F., Sun, L., Liu, Y., 2017. Identification and inhibitory activities of ellagic acid- and kaempferol-derivatives from Mongolian oak cups against α -glucosidase, α -amylase and protein glycation linked to type II diabetes and its complications and their influence on HepG2 cells' viability. Arabian Journal of Chemistry.

ZEMESTANI, M., RAFRAF, M., ASGHARI-JAFARABADI, M., 2016. Chamomile tea improves glycemic indices and antioxidants status in patients with type 2 diabetes mellitus. Nutrition 32(1), 66-72.

Zhao, J.-Q., Wang, Y.-M., Yang, Y.-L., Zeng, Y., Mei, L.-J., Shi, Y.-P., Tao, Y.-D., 2017. Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from "Liucha" (young leaves and shoots of *Sibiraea laevigata*). Food Chemistry 230, 117-124.

5. ANEXOS

6 ARTIGO

Teor de constituintes, avaliação antioxidante, efeitos antidiabéticos, antiglicação, anticolinesterásica de raízes *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg., em Ratos Wistar.

Thiago Félix de Miranda Pedroso^{a,1,*}, Thaise Regine Bonamigo¹, Jenifer da Silva¹, Paulo Vasconcelos¹, Jessica Maria Félix¹, Roosevelt Isaias Carvalho Souza¹, Ariany Carvalho dos Santos¹, Carla Roberta Ferreira Volobuff², Anelise Samara Nazari Formagio², Virginia Demarchi Kappel Trichez^{a,1,*}.

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

²Laboratório de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados

RESUMO

A hiperglicemia é a principal consequência da Diabetes Mellitus, que de forma crônica esta relacionada à formação de radicais livres, especificamente Produtos Finais da Glicação Avançada (AGES, do inglês Advanced Glycation end Products) e processos inflamatórios como nefropatia e neuropatia. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg., Bixaceae, é uma planta de cerrado conhecida por seu poder anti-inflamatório. O objetivo deste trabalho foi analisar o conteúdo dos constituintes, avaliar os efeitos antioxidantes, antiglicação, antidiabéticos e anticolinérgicos do extrato hidrometanólico das raízes de *C. regium*, através de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Foram analisados os teores de fenólicos totais, flavonóides, tanino condensado e flavonol. O teor dos constituintes majoritários foi avaliado através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography). A atividade antioxidante foi investigada através dos métodos DPPH, ABTS, método de β -caroteno/ácido linoleico e malondialdeído. A inibição de AGES foi examinada através de um sistema albumina sérica bovina cujo agente glicosilante foi à glicose. Inibição das dissacaridase foi avaliada através de métodos *in vitro* e *in vivo*. Houve análise da inibição da acetilcolinesterase (Ache) em estrutura cerebrais. Foi realizado Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) em animais normoglicêmicos que receberam sobrecarga de glicose, nos animais

diabéticos induzidos com aloxano e nos animais que receberam uma dieta hiperglicídica. O extrato hidrometanólico apresentou alta concentração de compostos fenólicos, flavonóides e um efeito antioxidante. A cromatografia líquida revelou uma maior concentração de ácido gálico, seguidos de menor teor de ácido caféico e ácido elágico. Houve inibição da formação de AGES significativamente. O TOTG dos animais normoglicêmicos demonstraram uma resposta significativa a uma dose de 100 mg/kg de *C. regium*, acompanhada de aumento do teor de glicogênio hepático. Houve também uma redução significativa na redução da glicemia em jejum de animais diabéticos induzida com aloxano após 7 dias de tratamento, com doses diárias de 100 mg/kg. Após 14 semanas de dieta hiperglicídica, sendo 4 de tratamento com dose de 100mg/kg, houve diminuição dos triglicerídeos. Assim, o extrato de *C. regium* apresentou efeitos promissores antioxidantes, antiglicação e antidiabéticos que podem estar relacionados ao seu alto conteúdo fenólico.

Palavras chaves: *Cochlospermum regium*, diabetes, antioxidantes, AGEs, aloxano, acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Hyperglycemia is the main consequence of Diabetes *Mellitus*, which is chronic related to the formation of free radicals, specifically Advanced Glycation End Products (AGES) and inflammatory processes such as nephropathy and neuropathy. *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg., Bixaceae, is a cerrado plant known for its anti-inflammatory power. The objective of this work was to analyze the contents of the constituents, to evaluate the antioxidant, antiglycation, antidiabetic and anticholinergic effects of the hydrometanolic extract of *C. regium* roots, through experimental models *in vitro* and *in vivo*. The total phenolics, flavonoids, condensed tannin and flavonol were analyzed. The content of the major constituents was evaluated through High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The antioxidant activity was investigated through the DPPH, ABTS, β -carotene / linoleic acid and malondialdehyde methods. Inhibition of AGES was examined by a bovine serum albumin system whose glycosylating agent was glucose. Inhibition of disaccharidase was assessed by *in vitro* and *in vivo* methods. There was analysis of the inhibition of acetylcholinesterase (Ache) in brain structure. The antidiabetic potential was performed in normoglycemic animals that received glucose overload, in diabetic animals induced with alloxan and in animals that received a hyperglycemic diet. The hydromethanolic extract presented high concentration of phenolic compounds, flavonoids and an antioxidant effect. Liquid chromatography revealed a higher concentration of gallic acid followed by caffeic acid and ellagic acid. There was significantly inhibition of AGES formation. The TOTG of normoglycemic animals demonstrated a significant response at a dose of 100 mg / kg *C. regium*, accompanied by an increase in hepatic glycogen content. There was also a significant reduction in fasting glucose of alloxan-induced diabetic animals after 7 days of treatment with daily doses of 100 mg / kg. After 14 weeks of hyperglycemia diet, 4 of the treatment with a dose of 100mg / kg, there was a decrease in triglycerides. Thus, the extract of *C. regium*

showed promising antioxidant, antiglycation and antidiabetic effects that may be related to its high phenolic content.

Keywords: *Cochlospermum regium*, Diabetes, Phenolic compounds, AGEs, Alloxan, acetylcholinesterase.

* Correspondente na Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12 - Cidade Universitária, Cx. Postal 364 - CEP 79804-970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Endereço de e-mail:

phelixpedroso@gmail.com (T.F.M. Pedroso), virginiakappel@ufgd.edu.br (V.D.Kappel) .

^a Estes autores igualmente contribuíram para este trabalho.

1 INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença de caráter multifatorial cuja consequência comum é a hiperglicemia. A homeostase normal da glicose é alcançada pela precisa regulação da produção e secreção de insulina pelas ilhotas de Langerhans do pâncreas. Esta homeostase também requer uma adequada resposta à insulina dos tecidos a ela sensíveis, como fígado, músculo e tecido adiposo. Uma resposta inapropriada da homeostase glicêmica pode levar ao diabetes [9-12].

A DM e suas complicações são uma das principais causas de mortes na maioria dos países [18]. A Diabetes *mellitus* tipo II (DMII) é a mais comum, e tem aumentado junto com as mudanças sociais e culturais [16, 18]. Em países de alta renda 91% de adultos com DM tem a tipo II [18].

É uma doença com etiologia heterogênea relacionada a distúrbios metabólicos crônicos, acompanhada de hiperglicemia e alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas. Frequentemente ao longo de vários anos, diversas complicações teciduais surgem como a nefropatia, neuropatia e a retinopatia [12, 19, 20].

A fisiopatologia da DM está relacionada com o metabolismo dos carboidratos e da ação da insulina. Os carboidratos presente nos alimentos são quebrados no intestino em moléculas menores, para que possam ser absorvidos, levados a corrente sanguínea e finalmente utilizados pelas células. A insulina, produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, se liga a receptores celulares específicos desencadeando uma série de reações que facilitam a

entrada de glicose, que por sua vez é utilizada como fonte de energia. O aumento da liberação de insulina aumenta o consumo de glicose pela célula e diminui a quantidade de glicose intravascular. Se a dinâmica de produção e liberação de insulina se modificar, subsequentemente a da glicemia também irá modificar. A utilização inadequada da insulina pela célula também leva a alterações no nível da glicemia [21, 22].

Pesquisas relatam que o estresse oxidativo está relacionado com o desenvolvimento do DMII. Radicais livres derivados do oxigênio, a proteína quinase C e produtos não enzimáticos da glicose e da albumina, denominados produtos finais da glicação avançada AGEs (do inglês *advanced glycation end products*), têm sido associados a essa disfunção [19, 25].

Cochlospermum regium, conhecida popularmente como algodãozinho do campo, é uma espécie bastante conhecida no cerrado. O gênero *Cochlospermum* Kunth. integra a família Bixaceae Kunth (Classe Equisetopsida, Subclasse Magnoliidae Novák ex Takht.) [48] [49]. Sua existência é relatada em regiões quentes e secas das Américas, África, Austrália, Paraguai e Bolívia. No Brasil, ela é comumente encontrada nas regiões do cerrado nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Bahia, Paraná, Pernambuco, Ceará e ainda na Amazônia [50].

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO VEGETAL

A raiz do *Cochlospermum regium* foi coletada no assentamento Lagoa Grande, distrito de Itahum, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, sob as coordenadas geográficas: 21°59'52,75" e 55°20'21,85". E a exsicata da espécie vegetal foi identificada pela Prof^a Dr^a Zefa Valdevina Pereira e esta registrada no herbário da Universidade Federal da Grande Dourados sob o registro nº 5406. A raiz foi lavada para retirada da sujidade, cortada em pedaços e levada a uma estufa com corrente de ar circulante por 6 dias. Após esse período os pedaços foram triturados em moinho de facas. Posteriormente houve maceração exaustiva com metanol : água (7:3) e o filtrado foi rotaevaporado a 60°C. Seguidamente o material foi liofilizado. E o rendimento foi de 21,9%.

2.2 TEOR DOS CONSTITUINTES

2.2.1 CONCENTRAÇÃO FENÓLICOS TOTAIS

A concentração total de fenol das amostras foi determinada utilizando reagente de folin [56]. Resumidamente, misturaram-se 100 µL de extrato em metanol (1g/L) com 1,0 ml de água destilada e 0,5 ml de reagente de folin-ciocalteau (1:10 v/v). Depois de misturar, adicionaram-se 1,5 mL de bicarbonato de sódio aquoso a 2% e deixou-se a mistura em repouso durante 30 min com agitação intermitente. A absorvância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração fenólica total é expressa como equivalente de ácido gálico em mg por grama de extrato. A solução de metanol foi utilizada como um branco. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2 CONCENTRAÇÃO TOTAL DE FLAVONÓIDES

A quantidade de flavonóides totais no extrato foi medida espectrofotometricamente como anteriormente relatado [57]. Resumidamente, misturaram-se 500 µL de cada extrato com 1,50 mL de etanol a 95%, 0,10 mL de cloreto de alumínio a 10% ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$), 0,10 mL de acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$) (1 M) e 2,80 mL de água destilada. Após incubação durante 40 min, a absorvância foi medida a 415 nm utilizando um espectrofotômetro. Para calcular a concentração o resultado foi expresso como equivalentes de quercetina em mg por grama de extrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.3 CONCENTRAÇÃO DE TANINO CONDENSADO (TC)

As concentrações de TC foram determinadas por uma versão modificada de um método relatado anteriormente [58]. As amostras de extrato foram misturadas com 5 mL de vanilina-HCl (8% HCl aquoso concentrado e 4% de vanilina em metanol). A absorvância a 500 nm foi lida após 20 min. A catequina foi utilizada como padrão. A concentração de tanino condensado é expressa como equivalentes de catequina em mg por grama de extrato.

2.2.4 CONCENTRAÇÃO DE FLAVONOL

Os flavonóis totais nos extratos vegetais foram estimados usando o método relatado anteriormente (Kamuran & Karunakaran, 2007). Para 2 mL de amostra, adicionaram-se 2 mL de AlCl_3 (2%) de etanol e 3 mL (50g/L) de acetato de sódio. A mistura foi agitada e incubada durante 2,5 h a 20 °C. A absorbância foi lida a 440 nm. Os flavonóis totais são expressos em mg de equivalentes de quercetina por grama de peso seco (mg QE / g extrato) utilizando a curva de calibração com quercetina.

2.2.5 HPLC - DAD

O extrato (10 mg) foi solubilizado em 10 mL do metanol:água 60:40 v: v. O extrato foi analisado em um sistema analítico de LC (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japão) com um detector de matriz de diodos (DAD, diode array detector) monitorado em $\lambda = 200 - 800$ nm. A coluna LC era um C-18 (25 cm x 4,6 mm, tamanho de partícula, 5 μm , Luna, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Na análise, a taxa de fluxo e o volume injetado foram ajustados como 1,0 mL min^{-1} e 10 μL , respectivamente. Todas as análises cromatográficas foram realizadas a 22 ° C. A eluição foi realizada utilizando água de fase móvel acidificada a 0,02% (p / v) com ácido tricloroacético (A) / acetonitrilo (B) (0 min 99% A e 1% B, 5 min 95% A e 5% B, 12 min 80% A e 20% B, 15 min 75% A e 25% B, 18 min 63% A e 37% B, 26 min 20% A e 80% B e 30 min 99% A e 1% B). Os padrões dos ácidos gálico, cafeico e elágico (Sigma, $\geq 97\%$) foram preparados na concentração inicial de 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As concentrações de compostos foram determinadas por calibração externa após diluição apropriada na faixa de 0,10-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A análise foi realizada em triplicado para cada nível de concentração de padrões e extraiu e injetou no sistema cromatográfico.

2.3 TESTES *IN VITRO*

2.3.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.3.1.1 CAPTAÇÃO DO RADICAL LIVRE

2.3.1.1.1 DPPH

O extrato hidrometanólico de *C. regium* foi preparado em diferentes concentrações: 0.1, 1, 10, 50, 100, 200, 300, 500 e 1000 µg/ml. Como padrão, foram utilizadas soluções de ácido ascórbico nas mesmas concentrações que o extrato.

Em seguida, foram adicionados 1800 µl de solução etanólica de DPPH (0,05 mM) e 200 µl de extrato ou a solução de ácido ascórbico em suas respectivas concentrações. A mistura foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro. A coloração inicial do DPPH é violeta e caso ocorra a captação dos radicais livres através do composto analisado, esta solução expõe coloração amarela. No entanto, para confirmar tal atividade, após o período pré-estabelecido de incubação, a absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro.

Para determinar a porcentagem de atividade antioxidante foi utilizada a seguinte equação: inibição do radical livre DPPH (%) = $(1 - \text{Abs amostra} / \text{Abs controle}) \times 100$, no qual Abs amostra é a absorbância da solução onde a amostra de extrato foi adicionada à solução de DPPH e Abs controle é a absorbância da solução de DPPH [59].

2.3.1.1.2 ABTS

A atividade antioxidante total foi medida utilizando um método melhorado de remoção de radical azino-bis (ácido etilbenzotiazolino – 6 – sulfônico / ABTS) [60]. Resumidamente, 7,0 mM de ABTS e 140 mM de persulfato de potássio foram misturados e mantidos no escuro durante 16 h à temperatura ambiente. Depois, adicionou-se 2 mL de solução de ABTS⁺ a 20 µL de diferentes concentrações de amostra (25 - 750 mg / mL). Após 6 min, a absorvância foi medida a 734 nm utilizando espectrofotômetro. Quercetina foi usada como referência. A atividade de eliminação de ABTS + (%) = $(A0 - A/A0) \times 100$; A0 é a absorvância da solução em branco e A é a absorvância do extrato hidrometanólico.

2.3.1.2 PEROXIDAÇÃO

2.3.1.2.1 MÉTODO DE β -CAROTENO / ÁCIDO LINOLEICO

A solução de β -caroteno foi preparada dissolvendo 2 mg de β -caroteno em 10mL de clorofórmio; 1 mL desta solução de β -caroteno-clorofórmio foi misturada com 20 mg de ácido linoleico e 0,2 g de Tween 40. Subsequentemente, o clorofórmio foi removido por um evaporador rotativo a 45 °C. Adicionou-se lentamente água destilada (50 mL) com agitação vigorosa para formar uma emulsão. Alíquotas de emulsão (5 mL) foram transferidas com 0,2 mL dos extratos de diferentes concentrações (10-200 μ g/mL, estoque de amostra 1,0 mg / mL). As amostras de controle foram preparadas com 0,2 mL de metanol desprovido de extrato [61, 62]. Logo que a emulsão foi adicionada a cada tubo, a absorvância foi lida a 470 nm. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C e a oxidação foi monitorizada por absorvância a intervalos de 15 minutos até que a cor do β -caroteno na amostra de controle tivesse desaparecido (105 min). Utilizou-se quercetina como referência. As análises foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante (AA) foi calculada como percentagem de inibição em relação ao controle: % AA = $[1 - (A_i - A_t) / (A'_i - A'_t)] \times 100$.

A_i = absorvância da amostra no tempo zero, A_t = absorvância da amostra após incubação (105 min) a 50 °C, A'_i = absorvância do controle no tempo zero e A'_t = absorvância do controle após incubação (105 min) a 50 °C.

3.4.1.1.1. MALONDIALDEÍDO (MDA)

A atividade antioxidante foi medida in vitro utilizando malondialdeído (MDA) com pequenas modificações [63]. Misturaram-se alíquotas de 50 μ l de extracto de *C. regium* em várias concentrações (25-100 mg/ml) com homogenato de tecido para o nível de MDA no tempo zero e após 60 minutos de incubação foram medidos através de reação com 1 ml de solução de ácido tricloroacético (20%) e centrifugado. O sobrenadante (0,5 ml) foi incubado durante 15 min a 80 °C e arrefecido com 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA, 0,67%) e a absorvância de TBA-MDA foi determinado a 535 nm utilizando um espectrofotómetro. A percentagem de inibição (%I) foi calculada utilizando a seguinte equação: % I = $1 - (A_i \text{ amostra} - A_t \text{ amostra} / A'_i \text{ controle} - A'_t \text{ controle}) \times 100$, A_i = absorvância da amostra no tempo zero, A_t = Absorvância da amostra após a incubação (60 min); A'_i = Absorvância do controle no tempo zero, e A'_t = Absorvância do

controle após incubação. Calculou-se o IC50 (a concentração necessária para 50% de inibição) utilizando o gráfico de % I em relação à concentração do extrato em µg/mL.

2.3.2 FORMAÇÃO DOS AGES NO SISTEMA DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA/GLICOSE

Os AGEs foram formados em um sistema *in vitro* conforme descrito por Kappel *et al.* 2012, adaptado [64]. A albumina sérica bovina (BSA) (10 mg/mL) foi incubada em solução fisiológica com glicose (500 mM) a 37° por 14 e 28 dias na ausência (controle) ou presença do extrato em três concentrações diferentes, 10µg/ml, 100 µg/ml e 1000 µg/ml. A albumina, glicose e os extratos foram adicionados simultaneamente para incubação. Cada tubo contendo a solução foi mantido protegido da luz, hermeticamente fechado e com uma solução conservante nipagin a 0,02%, e todas as amostras foram realizadas em triplicata em dois experimentos independentes. Nos tempos selecionados, a formação dos AGEs foi medida através da fluorescência característica em um leitor de fluorescência (Fluorímetro -Varian, Cary – Eclipse), onde o comprimento de onda de excitação foi de 370 nm e o comprimento de onda de emissão foi de 440 nm.

2.4 TESTES *EX VIVO*

2.4.1 DISSACARIDASES

Inicialmente foi preparada uma solução tampão fosfato a 0,1mol/L, com pH em iguala 6,0 e posteriormente soluções de lactose, maltose e sacarose a 0,112µM. Após os animais serem devidamente anestesiados, foram decapitados em guilhotina e a cavidade peritoneal foi aberta para o encontro do intestino início do intestino delgado. Parte do jejuno foi retirado, e colocado imediatamente em salina a uma baixa temperatura. O intestino foi lavado cuidadosamente para retirada do excesso de sujidade e pesado. Esse tecido foi triturado e o homogenato foi centrifugado em ependrofs a 10.000 RPM's por 8 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em baixa temperatura para realização do procedimento experimental.

Em um tubo de ensaio pequeno foi adicionado 25µl do extrato em sua respectiva concentração e colocado em banho-maria, à temperatura de 37°C, e com o tubo de ensaio no banho-maria, foi adicionado 50µl do sobrenadante retirado (homogenato), imediatamente após a adição do homogenato as amostras ficaram incubadas em banho-maria. Aos 5 minutos de incubação foram adicionados 25µl de substrato (maltose/sacarose/lactose) e deixados incubando em banho-maria a 37°C. Passados 5 minutos as amostras foram retiradas do banho e uma alíquota de 20µl destas amostras que estavam em incubação foram pipetadas em outro tubo de ensaio contendo 2ml de reagente Glicose Oxidase (GOD), deixadas reagir por 10 minutos em banho a 37°C. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção colorimétrica no comprimento de onda de 500nm.

2.4.2 INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE (AChE) EM ESTRUTURAS CEREBRAIS

No ensaio três grupos de seis ratos machos foram tratados separadamente por gavagem com extrato nas doses de 30 e 100 mg/kg, controle (0,9% salina). Após 60 min, os animais foram mortos por decapitação o cérebro (córtex, hipotálamo, hipocampo e estriado) foram coletados, e homogeneizados separadamente em solução tampão Tris-HCl 10 mmol, pH 7,2 com sacarose 160 mmol (1:10, p/v). A atividade da AChE de homogeneizado foi determinada pelo método de Ellman et al. (1961). O meio de ensaio contendo DTNB 1.04 mmol e tampão fosfato de potássio 24 mmol pH 7,2, foi incubado por 2 minutos a 30°C com 25 mL da amostra e a reação iniciada com adição de acetiltiocolina (ATC) 0,83mmol L⁻¹. O produto da reação foi determinado em 412 nm durante 2 min. A atividade foi expressa em mmol de ATC hidrolisada h⁻¹ mg de proteína⁻¹. A concentração de proteína das amostras do homogeneizado foi determinada pelo método de azul Coomassine (Bradford, 1976), utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão.

2.5 TESTES *IN VIVO*

2.5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 50 e 55 dias, obtidos no biotério central da Universidade Federal da Grande Dourados. Os animais foram mantidos com livre acesso a ração e água, em um ciclo de claro e escuro de 12 horas. Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho

Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (Protocolo nº 30/2015 CEUA/UFGD).

2.5.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG)

Foram utilizados 25 ratos divididos em cinco grupos com animais em cada grupo. Todos os animais receberam uma sobrecarga de glicose de 4g/kg de peso corporal, via oral. Trinta minutos antes da administração da glicose, foram administrados os tratamentos para cada grupo. Um grupo controle que recebeu apenas água, um grupo tratado com extrato a 30 mg/kg de peso corporal, um grupo tratado com extrato de 100mg/kg, um grupo tratado com extrato de 300mg/kg e um grupo tratado com medicamento de referência glibenclamida 100mg/kg. A glicemia foi verificada nos tempos de 15, 30, 60, 180 minutos.

2.5.3 INDUÇÃO DA DIABETES COM ALOXANO

A diabetes foi induzida com duas doses intraperitoneais de aloxano a 120mg/kg de peso corporal. A primeira e a segunda dose tiveram três dias de intervalo, e após quatro dias da segunda dose os animais que tiveram uma glicemia de jejum acima de 200 foram considerados diabéticos. Os animais foram divididos em dois grupos, um grupo controle e outro tratado com extrato hidrometanólico de *C. regium* (100mg/kg). Imediatamente após o tratamento a glicemia foi dosada em 1, 2 e 3 horas. Realizou-se um tratamento com dose única diária de 100mg/kg por 7 dias consecutivos. Ao final do tratamento, foi avaliada a glicemia de jejum dos animais.

2.5.4 INIBIÇÃO DAS DISSACARIDASES

Após TOTG's e a indução com aloxano parte do jejuno dos animais foi coletado, conforme procedimento relatado inicialmente na inibição das dissacaridases *in vitro*.

Em um tubo de ensaio pequeno foi adicionado 25µl do tampão fosfato e colocado em banho-maria, à temperatura de 37°C, e com o tubo de ensaio no banho-maria, foi adicionado 50µl do

sobrenadante retirado (homogenato), imediatamente após a adição do homogenato as amostras ficaram incubadas em banho-maria. Aos 5 minutos de incubação foram adicionados 25µl de substrato (maltose/sacarose/lactose) e deixados incubando em banho-maria a 37°C. Passados 5 minutos as amostras foram retiradas do banho e uma alíquota de 20µl destas amostras que estavam em incubação foram pipetadas em outro tubo de ensaio contendo 2ml de reagente Glicose Oxidase (GOD), deixadas reagir por 10 minutos em banho a 37°C. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção colorimétrica no comprimento de onda de 500nm.

2.5.5 AVALIAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO

Após o TOTG's parte do fígado foi coletada para dosagem do glicogênio hepático. Os animais foram anestesiados, decapitados em guilhotina. Posteriormente essa amostra foi adicionada a em tubos grande (\pm 8ml) juntamente com 2ml de KOH 30 %. Passaram então por fervura (100°C) até homogeneizar o tecido e Resfriados em temperatura ambiente. Foram acrescentados 5 ml de etanol 95%, agitados em vortex e aquecidos novamente a 70°C por 10 minutos. Na próxima etapa as amostras foram colocadas imediatamente no gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1 ml de água destilada as amostras. Foi retirado 30 µl da amostra anterior e adicionado a 1,3 ml de reagente de cor. Após 10 min foram feitas leituras a 460nm no espectrofotômetro.

2.5.6 DIETA HIPERGLICÍDICA

Foi elaborada uma dieta chamada altamente palatável, baseada no estudo de Naderali et al., 2001, na qual se utiliza 33% de ração PRESENCE[®] moída, 33% leite condensado da marca ITALAC[®], 27% água e 7% sacarose (2,78 calorias/g). A dieta foi mantida sob refrigeração até o momento da utilização, e a dieta normal ofertada (grupo controle normal) foi à ração comercial da marca PRESENCE[®] [65].

O experimento teve um período total de 14 semanas, e 20 animais foram utilizados, no início da dieta todos os animais tinham em média uma idade de 50 dias.

Nas 10 primeiras semanas os animais receberam apenas a ração definida para cada grupo, e nas 4 últimas semanas os animais foram tratados diariamente por gavagem, sempre no mesmo período do dia. Os animais dos grupos tratados receberam o extrato de *C. regium* a 100mg/kg de peso corporal e os animais dos grupos controles receberam água como veículo.

Os animais foram divididos em quatro grupos com *n* de 5. Os dois primeiros grupos receberam a dieta hiperglicídica, sendo que um grupo da dieta hiperglicídica recebeu apenas o veículo (Grupo dieta hiperglicídica controle, “HC”) e outro grupo recebeu o extrato como tratamento (Grupo dieta hiperglicídica tratados, “HT”). Os outros dois grupos receberam a ração comercial sem nenhum aditivo hiperglicídico, sendo um grupo controle que recebeu apenas água por gavagem diariamente (Grupo dieta normal controle “NC”), e outro grupo recebeu extrato de *C. regium* por gavagem (Grupo dieta normal tratados “NT”). Os testes orais de tolerância à glicose foram realizados no início e no final do tratamento. No final do tratamento, o sangue foi coletado. O soro foi obtido por centrifugação a 4000 rpm (4 °C) durante 15 minutos para realizar parâmetros bioquímicos, como medidas de glicose sérica, colesterol total, colesterol LDL, colesterol-HDL, aspartato transaminase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) os níveis foram determinados usando o equipamento cobas integra 400 plus, do Laboratório do Hospital Universitários (HU/UFGD). O fígado e o pâncreas foram removidos, examinados macroscopicamente e as amostras de órgãos também foram fixadas em 10% de formalina, desidratadas com álcool e xileno, incorporadas em cera de parafina, seccionadas, montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina / eosina. E o certificado da avaliação histopatológica foi realizado por dois patologistas veterinários. Foram realizadas análises histológicas em todos os grupos.

2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificadas. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT versão 2.02 ou o programa Graph Pad Prism versão 5.01. Também será utilizado para

avaliação de algumas amostras o teste “t” de Student Newman-Keuls. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para “p” igual ou menor que 0,05.

3 RESULTADOS

3.1. TEOR DE CONSTITUINTES

O extrato hidrometanólico apresentou elevada concentração de compostos fenólicos (1443.04 ± 8.34 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato), e flavonoides (708.75 ± 12.54 mg de equivalentes de quercetina/g de extrato), seguido pelo menor conteúdo de flavonol (306.97 ± 10.29 mg de equivalentes de quercetina/g de extrato) e taninos condensados (218 ± 4.73 mg de equivalentes de catequina/g de extrato).

Os dados de Cromatografia Líquida (CL) com extrato mostraram três ácidos fenólicos, ácido gálico (Rt = 7.33 min; 114,26 mg/g), ácido cafeico (Rt = 18,17 min; 40,1 mg/g) e ácido elágico (Rt = 21,87 min; 27,9 mg/g) (Figura ..)

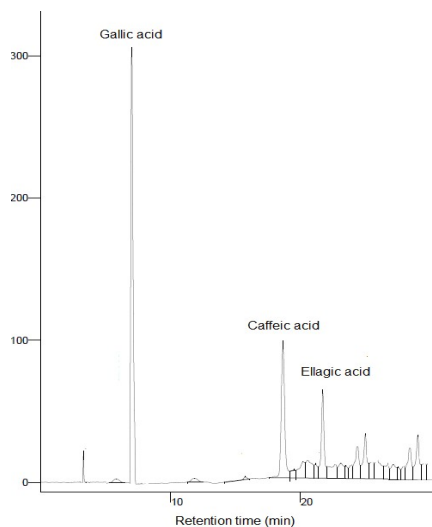


Figura 1.: Dados CL do extrato hidrometanólico de *C. regium*.

3.3 ANTIOXIDANTES

O efeito antioxidante do extrato hidrometanólico com base no ensaio de branqueamento do β -caroteno/ácido linoleico (Tabela 1) revelou potencial inibição de oxidação ($IC_{50} = 85.50$ μ g/ml), comparável ao padrão natural quercetina (70.65 μ g/ml). No modelo espontâneo de

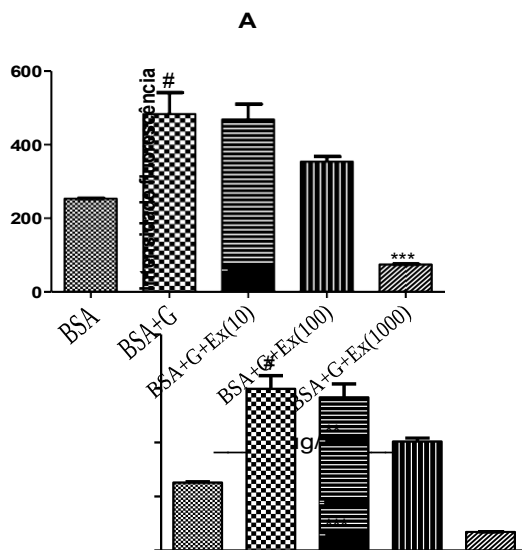
lipoperoxidação utilizando homogeneizado de cérebro de ratos, incubado em condições controladas de temperatura e oxigenação o extrato exibiu atividade com um IC_{50} de 68.88 $\mu\text{g/ml}$, quando comparável ao padrão (54.32 $\mu\text{g/ml}$), contribuindo para a menor geração de MDA, que é um produto tóxico resultante da degradação da membrana celular por peroxidação lipídica, causando rupturas de células e mutações. Por outro lado, com relação ao sequestro de radicais livres, os dados mostraram que o extrato exibiu a maior atividade ($IC_{50} = 14.68 \mu\text{g/ml}$) no ensaio utilizando o reagente DPPH, quando comparado com o reagente ABTS (Tabela 1).

Tabela 1. Os efeitos antioxidantes em ensaios de DPPH, ABTS, β -cartoneo/ácido linoleico e MDA.

Amostras	Sequestro de Radical		Peroxidação	
	DPPH	ABTS	β -Caroteno/ácido linoleico	MDA
$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$				
Extrato <i>C. regium</i>	14.68 \pm 1.05	138.71 \pm 6.65	85.5 \pm 2.23	
Quercetina	-	56.76 \pm 3.76	70.65 \pm 1.65	
Ácido ascórbico	11.50 \pm 1.18	-	-	

Os valores são expressos como média \pm SEM; IC_{50} = concentração que resulta em 50% de inibição, derivada do gráfico de I% (percentagem de inibição) versus concentração em $\mu\text{g/mL}$.

3.3. INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DOS AGES NO SISTEMA DE ALBUMINA SÉRICA BOVINA/GLICOSE



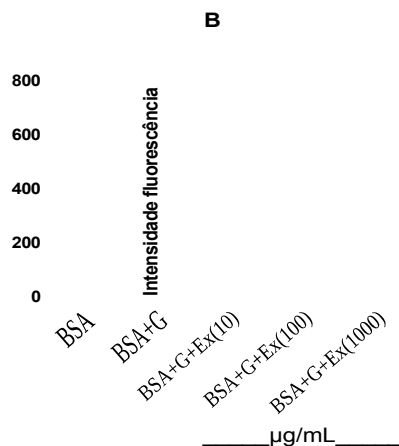


Figura 2. Efeito inibidor do extrato hidroalcoólico de raízes do *C. regium* na formação de AGES fluorescentes em um sistema BSA/glicose. **A**, 14 dias de BSA/glicose; **B**, 28 dias de BSA/glicose. As amostras de cada grupo foram realizadas em triplicata. Significativamente diferente os grupos BSA e BSA+Glicose # igual a $**P<0,01$, e de extrato de 100µg e 1000µg em relação ao grupo BSA + Glicose $**P<0,01$, $***P<0,001$

Na figura 2 pode ser observada a diferença na intensidade da fluorescência dos grupos BSA, BSA+Glicose e nos grupos BSA+Glicose+Extrato em diferentes concentrações.

Após incubação para ambos os períodos analisados, houve diferença estatística nos grupos BSA e BSA+GLICOSE, tanto nos períodos de 14 e 28 dias, ficando evidente que a formação de AGES foi significativamente aumentada (figura 2 A, B). A Figura 1A demonstrou a capacidade de inibição da fluorescência dos extratos, em diferentes concentrações, de maneira mais evidente na concentração de 1000µg/ml, de *C. regium* em 14 dias. Também, como ilustrado na figura 2 B os extratos inibiram a fluorescência, em um período de 28 dias, nas concentrações de 100µg/ml e de 1000µg/ml.

3.4 EFEITO DO EXTRATO HIDROMETANÓLICO DE *C. REGIUM* NA ATIVIDADE DAS DISSACARIDASES

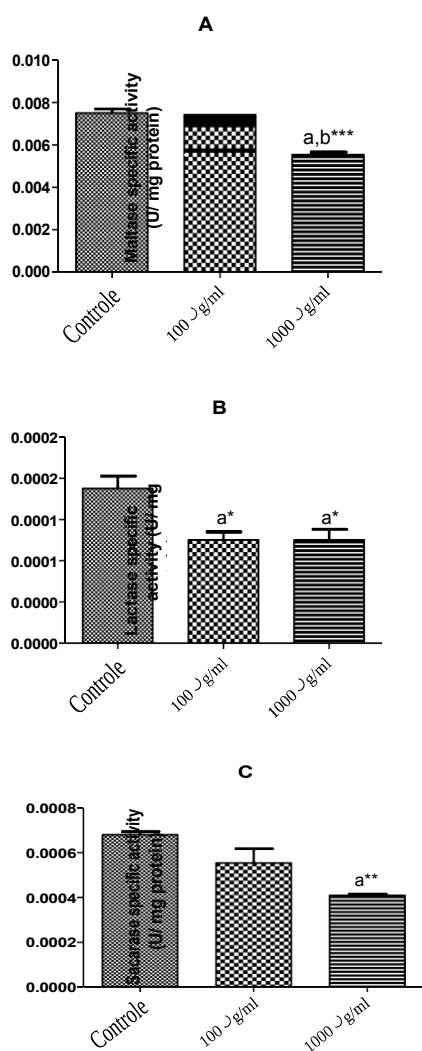


Figura 3. Efeito in vitro do extrato hidrometanólico do *C. regium* sobre a atividade da Maltase figura 2A, Lactase figura 2B e Sacarase figura 2C. O grupo controle sem tratamento representa 100% de atividade específica das respectivas dissacaridases. Os valores são expressos com média \pm DPM, N=3 para cada grupo, * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Na figura 3A houve uma diminuição, com significado estatístico, na atividade enzimática da maltase na dose de 1000 μ g/ml, quando comparado com o controle e com a dose de 100 μ g/ml. A figura 3B demonstrou uma diminuição na atividade da lactase tanto nas doses de 100 quanto de 1000 μ g/ml. A figura 3A também demonstrou uma diminuição da atividade enzimática da sacarase na dose de 1000 μ g/ml.

3.5. TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TOTG)

3.5.1 RESULTADOS DO TOTG

Tabela 2. Efeito agudo do extrato hidrometanólico do *C. regium* nos níveis séricos da glicose (mg/dL) na curva oral de tolerância à glicose.

Tempo (min.)	Grupos tratados com <i>C. regium</i>				
	Controle	30 mg/kg	100mg/kg	300mg/kg	Glibencl.
0	69,4 ± 0,4	80,4 ± 3,0	77,2 ± 3,1	77,8 ± 3,7	86,4 ± 3,9
15	169,8 ± 11,8	167,6 ± 3,9	152,4 ± 16,5	184,2 ± 15,3 ^{c*}	127,0 ± 4,9 ^{c*}
30	187,0 ± 12,1	184,6 ± 4,7	155,8 ± 12,7 ^{a**, b*}	176,4 ± 2,1	139,2 ± 4,3
60	187,4 ± 10,8	188,0 ± 3,5	140,8 ± 7,0 ^{a, b***}	187,4 ± 13,1 ^{c***}	141,2 ± 7,3 ^{c***}
180	117,0 ± 8,3	131,4 ± 3,5	94,8 ± 2,5 ^{b**}	100,4 ± 4,8 ^{b*}	88,4 ± 8,6 ^{b*}

Os valores são expressos como média ± SEM; N= 5. Diferença estatisticamente significativa, *a* em relação ao controle, *b* em relação à concentração de 30 mg/kg, *c* em relação à concentração de 100mg/kg, * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Após o início do teste de tolerância à glicose, com uma dose de 4 g de glicose/kg de peso corporal, os níveis séricos de glicose aumentaram significativamente quando comparada com o tempo zero. O hipoglicemiante oral de referência foi a Glibenclamida (100mg/kg), uma sulfonilureia de segunda geração, como controle positivo, produzindo uma diminuição típica da glicose nos tempo de 15, 30 e 60 minutos quando comparada com o grupo controle hiperglicêmico (tabela 3). O *C. regium* (100mg/kg) demonstrou um melhor perfil anti-hiperglicêmico nos tempos de 30 e 60 minutos. A tabela também mostra as glicemias dos testes de tolerância a glicose nas concentrações de *C. regium* de 30 e 300 mg/kg mostrando-se ineficazes para diminuição da glicemia durante o teste. Podemos perceber ainda na tabela 2 que o grupo de 100mg/kg teve uma diferença, com significado estatístico, em relação aos grupos de 30 e 300mg/kg, principalmente no tempo de 60 minutos.

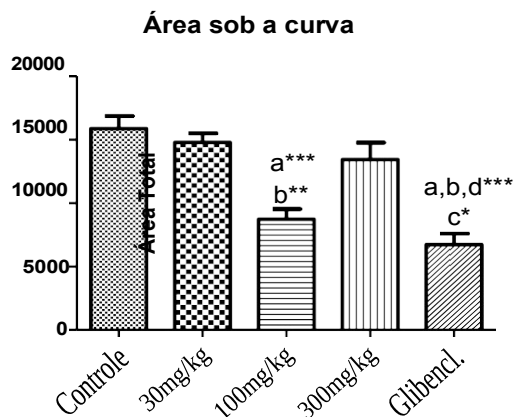


Figura 4 Resultados da área sob a curva das médias dos TOTG. Diferença estatisticamente significativa, *a* em relação ao controle, *b* em relação à concentração de 30 mg/kg, *c* em relação à concentração de 100mg/kg e *d* em relação ao grupo de 300mg/kg, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

A figura 4 demonstra a área sob a curva das médias de cada teste de tolerância à glicose. Esta figura mostrou que na dose de 100mg/kg de peso corporal a área foi a mais próxima do grupo tratado com a Glibenclamida. O grupo de 100mg/kg também teve uma diferença estatística com relação ao grupo de 30mg/kg. Já o grupo tratado com o medicamento de referência Glibenclamida teve uma diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controle, 30, 100 e 300mg/kg.

3.5.2 RESULTADOS DA DOSAGEM O GLICOGÊNIO HEPÁTICO

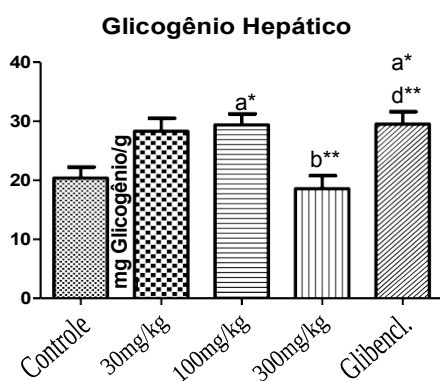


Figura 5. Resultado da quantificação de glicogênio hepático após o TOTG. Diferença estatisticamente significativa, *a* em relação ao controle, *b* em relação à concentração de 30 mg/kg e *d* em relação ao grupo de 300mg/kg, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Houve aumento de armazenamento hepático de glicogênio com significado estatístico nos grupos de 100mg/kg e Glibenclamida em relação ao controle. Já no grupo de 300mg/kg houve diminuição do armazenamento hepático em relação ao grupo de 30mg/kg, e no grupo da Glibenclamida teve um aumento do armazenamento hepático em relação ao grupo controle e ao grupo de 300mg/kg.

3.5.3 DOSAGEM DAS DISSACARIDASES APÓS O TOTG

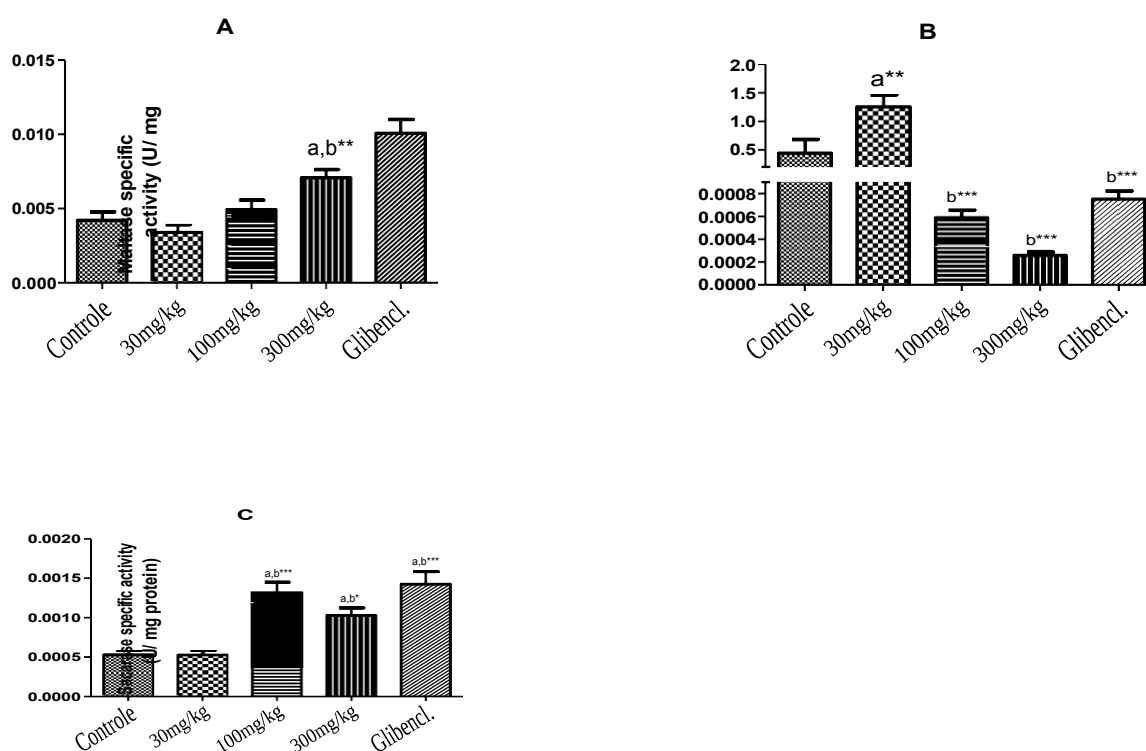


Figura 6. Efeito *ex vivo* do extrato hidrometanólico do *C. regium* sobre a atividade da Maltase figura 6A, Lactase figura 6B e Sacarase figura 6C. O grupo controle sem tratamento representa 100% de atividade específica das respectivas dissacaridases. Os valores são expressos com média \pm DPM, * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

No grupo da maltase houve um aumento na atividade enzimática com significado estatístico no grupo de 300mg/kg. No grupo da sacarase também houve um aumento significativo na atividade enzimática nos grupos de 100, 300mg/kg e Glibenclamida. Já no grupo da lactase tivemos, um aumento da atividade enzimática apenas no grupo de 30mg/kg, e as

outras concentrações demonstraram uma diminuição marcante na atividade enzimática da lactase, com significado estatístico nos grupos de 100, 300mg/kg e Glibenclamida, em relação a concentração de 30mg/kg (figura 5).

3.6. ANIMAIS DIABÉTICOS

Tempo	Controle	<i>C.regium</i> 100mg/kg
0h	382,2 ± 25,9	380,7 ± 31,7
1h	356,0 ± 24,2	326,2 ± 48,8
2h	388,2 ± 26,1	317,0 ± 51,0
3h	353,2 ± 21,3	304,7 ± 54,0
7dias	387 ± 56,9	155,3 ± 37,9***

Tabela 3. Efeito do extrato hidrometanólico do *C. regium* nos níveis séricos da glicose (mg/dL) nos animais diabéticos induzido com aloxano, cada grupo com n de 6. Os valores são expressos como média ± SEM; N= 6. Diferença estatisticamente significativa após 7 dias de tratamento em relação ao grupo controle ***P<0,001.

Os animais induzidos com aloxano demonstraram ter uma glicemia de jejum acima de 200mg/dL. Após o tratamento por 7 dias os animais tratados demonstraram uma redução da glicemia de jejum, em relação aos animais do grupo controle (Tabela 3).

3.6.2 RESULTADOS DA DOSAGEM O GLICOGÊNIO HEPÁTICO

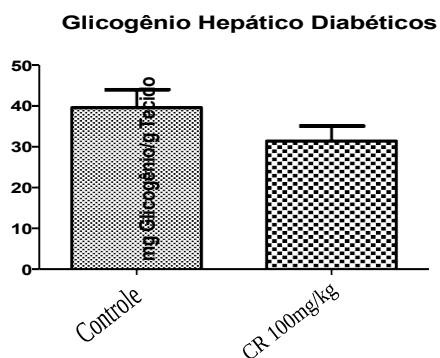


Figura 7. Resultado da quantificação de glicogênio hepático dos animais diabéticos após 7 dias de tratamento.

Não houve diferença estatística nas dosagens de glicogênio hepático após 7 dias de tratamento.

3.7. DIETA HIPERGLICÍDICA.

3.7.1 TOTG DOS ANIMAIS DA DIETA HIPERGLICÍDICA

Tabela 4 TOTG's no início e no final da dieta hiperglicídica.

Tempo	Glicose em mg/dL							
	Início				Final			
	HC	HT	NC	NT	HC	HT	NC	NT
0	75±1,8	74±2,0	70±1,9	72±5,7	123±5,0 ^{***}	111±9,5	107±6,8	101±8,4
15	129±4,8	155±13,1	131±9,6	145±12,1	153±18,0	112±4,6	124±6,5	120±6,9
30	131±5,0	159±14,5	148±14,8	151±9,7	165±8,0 ^{a*}	144±27,0	168±22,5	137±11,3
60	135±5,3	150±9,7	139±16,2	150±9,0	165±2,9 ^{a*}	165±27,8	153±10,0	147±17,2
120	131±5,9	113±8,2	115±12,9	122±7,2	145±7,2	150±10,4	136±8,3	136±16,2
180	115±4,6	102±3,9	104±14,8	108±3,7	134±1,7	136±8,0	112±6,0	119±10,1

Os valores são expressos como média ± SEM; N=5. Diferença estatisticamente significativa, * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. *a* em relação ao grupo HC no início do tratamento.

A Tabela 4 demonstrou que houve um aumento com significado estatístico no grupo da dieta hiperglicídica controle, na glicemia de jejum dos animais, e também no tempos de 30 e 60 minutos.

3.7.2 GLICEMIAS DE JEJUM

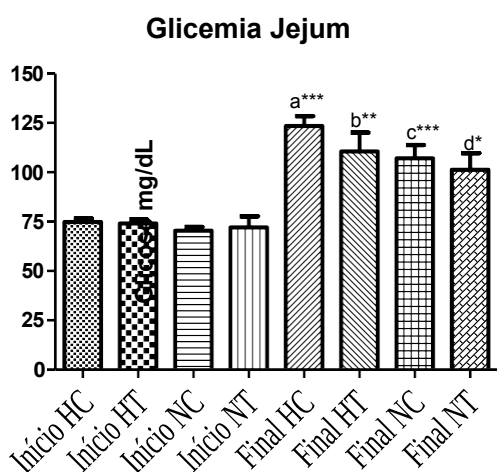


Figura 8. Representa somente as glicemias de jejum no início e no final da dieta hiperglicídica. Diferença estatisticamente significativa, *a* em relação ao controle da dieta hiperglicídica no início do tratamento, *b* em relação ao grupo tratado da dieta hiperglicídica no início do tratamento, *c* em relação ao grupo com ração normal controle no início do tratamento e *d* em relação ao grupo com ração normal e tratado no início do tratamento, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Na dieta hiperglicídica após quatro semanas de tratamento os dois grupos que receberam a dieta hiperglicídica, o grupo controle e o grupo tratado, tiveram um aumento significativo na glicemia de jejum (figura 8).

3.7.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Tabela 5. Resultados bioquímicos após 14 semanas da dieta hiperglicídica.

	Grupos			
	HC	HT	NC	NT
TGP (U/L)	48,2 ± 11,5	28,4 ± 5,2	33,1 ± 2,6	41,9 ± 7,5
TGO (U/L)	71,64 ± 4,2	67,1 ± 5,4	83,5 ± 6,3	89,3 ± 4,8
Colesterol (mg/dL)	63,0 ± 2,9	54,8 ± 2,9	63,6 ± 2,6	64,0 ± 5,2
HDL (mg/dL)	55,9 ± 3,7	46,1 ± 1,7	55,7 ± 2,5	55,6 ± 4,4
Triglicerídeos (mg/dL)	107 ± 6,0	68 ± 5,1 ^a *	63,8 ± 4,3 ^a **	70,8 ± 8,7 ^a *
VLDL (mg/dL)	20,48 ± 1,3	16,1 ± 2,5	14,3 ± 3,1	14,1 ± 1,7
HbA1c (%)	3,9 ± 0,06	4,0 ± 0,05	3,9 ± 0,04	3,9 ± 0,04

Diferença estatisticamente significativa, *a* em relação ao controle da dieta hiperglicídica, * P<0,05, **P<0,01.

A tabela 5 demonstra os resultados dos testes bioquímicos realizados no sangue no final da dieta hiperglicídica. Os animais que receberam somente a dieta hiperglicídica (HC) apresentaram um aumento significativo dos triglicerídeos quando comparado aos animais que receberam somente a dieta comercial padrão (NC). O tratamento com o extrato de *C. regium* diminuiu significativamente os triglicerídeos nos animais que receberam a dieta hiperglicídica. Em relação aos outros parâmetros bioquímicos analisados não foram observadas diferenças estatísticas. Os marcadores hepáticos TGO e TGP, não obtiveram alterações significativas. Nenhuma alteração significativa foi observada por necropsia ou análise histopatológica em todas as amostras de pâncreas e fígado analisadas (dados não apresentados).

3.8 INIBIÇÃO DA AChE

Os resultados demonstraram que a administração oral do extrato hidrometanólico nas doses 30 e 100 mg/kg na atividade de inibição da AChE foi alterada nas diferentes estruturas cerebrais (Figura 9). A Figura 9A demonstrou que o grupo tratado com o extrato na dose de 100

mg/kg inibiu AChE significativamente no córtex cerebral (69%), em comparação com o grupo de controle ($p < 0.001$). Em adição, o nível de inibição também foi observado nos animais tratados com o extrato nas doses de 30 mg/kg (11.79%) ($p < 0.01$) e 100 mg/kg (53.76%) ($p < 0.001$) no hipocampo (Figura 9B) e na estrutura do hipotálamo nas doses de 30 e 100 mg/kg, inibindo 27.78% e 42.20% ($p < 0.001$), respectivamente (Figura 9C). Na região do estriado o extrato não afetou a inibição da AChE (Figura 9D).

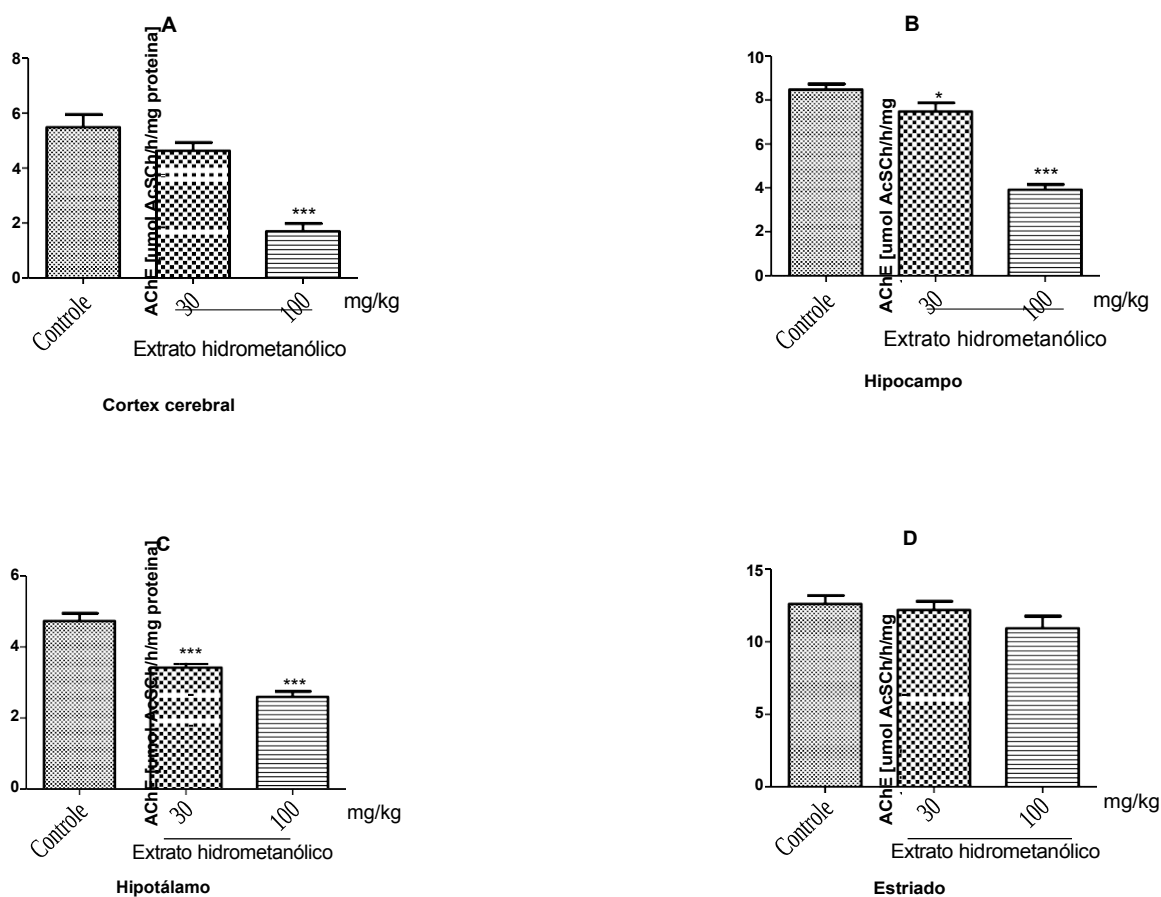


Figura 9 Efeito extrato hidrometanólico na AChE no córtex cerebral (A), hipocampo (B), hipotálamo (C) e estriado (D). Valores foram expressos como medias \pm SEM. $n=6$ Observações por grupo. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ entre controle e grupo tratado.

4. DISCUSSÃO

A diabetes *mellitus* é uma condição crônica que ocorre por disfunção na produção e/ou utilização de insulina. Esta última é produzida no pâncreas, e esta envolvida na captação da glicose pelas células. Desta forma, a falta ou diminuição da insulina dificulta a utilização da glicose pelas células causando hiperglicemia. Com o tempo, os altos níveis de glicose juntamente com a produção excessiva de radicais livres, como os AGEs, causam danos aos tecidos [18, 25]. Por outro lado, os compostos fenólicos, uma espécie de antioxidante natural, podem potencialmente proporcionar proteção contra o desenvolvimento de certas doenças crônicas ligadas à produção excessiva de radicais livres [66].

No presente estudo, investigamos a capacidade do extrato hidrometanólico de *C. regium* em melhorar parâmetros bioquímicos, inibição das dissacaridases e acetilcolinesterase e inibição da formação de AGEs, em modelos *in vitro* e *in vivo*. Nossos dados demonstraram que a sobrecarga de glicose no TOTG, a indução com aloxano e a dieta hiperglicídica aumentaram os níveis de glicemia. Além disso, demonstramos que a administração do extrato hidrometanólico *C. regium* reduziu a glicemia neste modelos experimentais.

Dados da literatura sugerem que membros do mesmo gênero de *Cochlospermum regium*, como *C. tinctorium* e o *C. vitifolium* são ricos em compostos fenólicos com propriedades em atuar na diminuição da glicemia além de atividades vasorelaxante e hepatoprotetora, podendo atuar na síndrome metabólica [67] [68]. Ainda há estudos que citam a redução dos níveis de glicemia, triglicerídeos e colesterol em ratos diabéticos induzidos com aloxano e tratados com extrato aquoso das raízes de *C. planchonii* [69].

Em ensaios fitoquímicos tradicionais realizados por via úmida descreveram que a raiz de *C. regium* possui taninos e outros compostos fenólicos, além de mucilagens, saponinas, esteróides, triterpenos e flavonóides. Desta última classe houve o isolamento do canferol, naringenina, aromadendrina e diidrocamferol-3-*O*-β-glicopiranosídeo, os quais demonstraram capacidade antioxidante [45, 46]. Guo et al., relatam que os flavonóides do alcaçuz estão ganhando popularidade devido suas atividades biológicas significativas como anti-úlceras, antioxidante, anti-inflamatório, anti-microbiano e atividade preventiva da síndrome metabólica [70]. Nossos resultados demonstraram que o extrato de *C. regium* possui alto teor de compostos

fenólicos totais e de flavonoides, os quais poderiam justificar a atividade antioxidante encontrada. Em nosso trabalho, foram relatados os compostos majoritários do extrato de *C. regium*, como sendo o ácido gálico, ácido caféico e o ácido elágico através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). Em conformidade, estudos que avaliaram a capacidade antioxidante e teor de constituintes por HPLC, foram encontrados compostos fenólicos, inclusive ácidos gálico, caféico e elágico, onde tiveram uma boa atividade antioxidante e inibidora de glicosidases intestinais [71] [72]. Estudos anteriores demonstraram o potencial antidiabético, antioxidante e anti-inflamatório do ácido elágico [73].

Pesquisas revelam evidências adicionais de que o estresse oxidativo tem um papel importante na lesão tecidual induzida por hiperglicemia, bem como em eventos iniciais relevantes para o desenvolvimento de DM2, sendo que a formação de AGEs, uma espécie de radical livre que modifica grupos de proteínas e/ou lipídios com potencial prejudicial, é um fator contribuinte [25]. No entanto, comparando com o ácido ascórbico, o extrato de *C. regium* demonstrou uma atividade inibidora do radical DPPH em uma concentração próxima ao padrão. Já no método de inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e MDA, o extrato de *C. regium*, apresentou atividade antioxidante quando comparado com o padrão quercetina. Os resultados sugeriram que compostos fenólicos poderiam ser considerados como principais componentes antioxidantes do *C. regium*. O extrato hidrometanólico de *C. regium* demonstrou uma resposta significativa na diminuição da intensidade da fluorescência, demonstrando que o *C. regium* possui a capacidade de prevenir a formação de AGEs nos sistema BSA/glicose. Kappel *et al* tiveram resultados semelhantes com o tratamento de *Musa x paradisiaca* na prevenção de formação de AGEs. Bahmani *et al* relataram sobre os efeitos benéficos sobre a DM de muitas substâncias encontradas em plantas como alcaloides, flavonóides, terpenos e compostos fenólicos, e cita ainda o camferol 3-O- β -D glicopiranosídeo como inibidor da glicação [64, 74].

A atividade antiglicação implicada aqui aos extratos de *C. regium*, podem estar ligadas ao seu potencial antioxidante, como relatada na inibição do DPPH e do ABTS. Já Adisakwattana *et al*, 2017, tiveram uma promissora inibição de AGEs e atividade de eliminação de radical livre DPPH com a utilização de ácido gálico e ácido ascórbico na formação da glicação e oxidação de proteínas induzidas por frutose [75].

A hiperglicemia é a principal causa patológica e a resistência à insulina é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DMII, portanto a procura por meios farmacológicos que reduzam esse risco são de grande importância para a área médica. Na resistência a insulina os tecidos como músculo esquelético e fígado respondem de maneira inadequada à insulina, desregulando a homeostase da glicose [76]

Dessa forma, estudos relatam que polifenóis podem influenciar o metabolismo de carboidratos em vários níveis, melhorando a resposta glicêmica pós-prandial, hiperglicemia de jejum, secreção aguda e sensibilidade à insulina. Em associação, uma das estratégias para o controle e prevenção da DM é limitar a taxa de absorção da glicose dos alimentos restringindo a sua absorção pela corrente sanguínea. Os fármacos utilizados atualmente incluem a Acarbose, Miglitol e a Voglibose, mas estes têm desagradáveis efeitos secundários, pelo fator de não serem seletivos [77-79]. Em estudo sobre derivados do ácido caféico extraídos da *Wedelia trilobata* Ren et al. 2017, relatam sobre os resultados significativos na inibição da alfa glicosidases quando comparados com a Acarbose [80]. Em adição, Rolffy Ortiz et al, 2009, verificaram que a administração oral do extrato metanólico do *Cochlospermum vitifolium* resultou na diminuição significativa do níveis de glicemia em ratos normoglicêmicos e diabéticos com estreptozotocina e nicotinamida, e também redução da glicemia após administração de glicose e sacarose. Ainda, o extrato inibiu a atividade enzimática *in vitro* das α -glicosidases de maneira dependente da concentração, além da redução dos níveis de glicemia, colesterol, HDL e triglicerídeos [82]. Embora os mecanismos relacionados ao *C. regium* ainda não foram elucidados, eles podem estar associados à inibição da digestão de carboidratos e absorção de glicose no intestino, entre outros, já que nos observamos inibição das dissacaridases *in vitro* [73] [83]. Ainda, Yin et al 2017, demonstraram a atividade inibitória do ácido elágico e do canferol do extrato de “mongolian oak cups”, sobre a alfa-glicosidases e a glicação relacionados ao DMII [84]. Oboh et al 2016 estudaram a associação de ácido gálico com o medicamento de referência Acarbose, utilizado como inibidor da alfa glicosidases e alfa-amilase, com promissores resultados na diminuição dos efeitos colaterais do medicamento [85].

Em cooperação, a eficácia terapêutica do ácido gálico, do *Cyamopsis tetragonoloba*, foi testada em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e dieta hiperlipídica e tiveram uma melhora no transporte de glicose dependente de insulina no tecido adiposo através da

translocação e ativação da proteína transportadora 4 (GLUT4) pela via de sinalização do PI3K/p-Akt [86]. Isso pode estar em consonância com o composto majoritário encontrado em nosso trabalho, ácido gálico, salientando o potencial de redução da glicemia nos animais diabéticos.

Em conformidade, a estimulação de produção de glicogênio, principalmente em paciente diabético e/ou resistente a glicose, em condições pós-prandiais, vem se tornando um modelo de alvo terapêutico para esta patogenia. Conseqüentemente a descoberta de uma substância que de alguma forma atuem neste mecanismo será de grande valia [87]. O glicogênio é um polímero altamente ramificado de glicose, existente predominantemente no cérebro, no músculo, no coração e no fígado, funcionando como uma fonte para liberar ou armazenar glicose conforme apropriado. Jiang et al., demonstraram que o glicogênio hepático em camundongos db/db (um modelo animal de diabetes tipo 2) apresentou quantidades semelhantes de partículas de glicogênio no fígado saudável. No entanto, as partículas de camundongos diabéticos são muito mais frágeis que as dos camundongos saudáveis, esse fenômeno pode estar relacionado à hiperglicemia [88]. Isso poderia explicar em parte o resultado, em relação ao armazenamento hepático em nosso estudo, nos animais normoglicêmicos que receberam um sobrecarga de glicose, o extrato de *C. regium* teve uma melhor atuação no armazenamento de glicogênio hepático. O aumento do armazenamento hepático pode justificar a diminuição das glicemias durante as curvas glicêmicas durante o TOTG.

Nas avaliações das provas bioquímicas de TGO, TGP, colesterol, glicemia, HDL, triglicerídeos, VLDL e HbA1c dos animais da dieta hiperglicídica, tivemos um melhor efeito na diminuição da concentração de triglicerídeos nos grupos HT, NC e NT em relação ao HC. Os marcadores hepáticos, em muitos trabalhos são utilizados como provas de toxicidade, nossos resultados de TGO e TGP não se mostraram alterados, reiterando trabalhos anteriores sobre a segurança na utilização de extratos de *C. regium*. Em nosso trabalho demonstramos que não houveram alterações histopatológicas a nível pancreático e hepático após administração dos extrato hidrometanólico de *C. regium*, corroborando com a não toxicidade do extrato. Nankar e Dobel, 2017 demonstraram uma melhora na hiperglicemia, dislipidemia, sem alteração nos marcadores hepáticos TGO e TGP, além da melhora dos níveis de expressão do GLUT 4 quando utilizaram ácido elágico em associação com a pioglitazona [89]. Já Karimi-Khouzani et al 2017 demonstraram diminuição significativa dos níveis de TGO e TGP na utilização de ácido elágico

na melhora de problemas hepáticos provocados pelo uso crônico de fluoxetina [90]. Toledo et al analisaram os níveis bioquímicos no soro de ratos machos tratados com extratos de *C. regium*: colesterol, triglicérides, lipídios totais, ureia, albumina, proteínas totais e creatinina, TGO e TGP, fosfatase alcalina e glicose, não encontrando alterações estatisticamente significativas [54]. Em estudo com cultura de células resistentes à insulina foi avaliado o poder hipoglicêmico do ácido gálico e sua influência no metabolismo hepático dos carboidratos em ratos que receberam dieta rica em frutose. A hipótese é que ácido gálico reduz a hiperglicemia através da melhora da resistência à insulina hepática, suprimindo a inflamação hepática e adequando o metabolismo anormal do carboidrato hepático, diminuindo a gliconeogênese hepática e aumentando a glicogênese hepática e as vias de glicólise [91].

Ainda sobre os possíveis mecanismos antidiabéticos, estudos relatam sobre as dificuldades da indução da diabetes através de fármacos como o aloxano, no entanto, ainda é um indutor de diabetes em animais bastante utilizado pelo seu baixo custo quando relacionado a estreptozotocina [92]. O aloxano possui a capacidade de destruir as células β do pâncreas através de um mecanismo de produção excessiva de radicais livres. Portanto, a administração profilática de substâncias antioxidante poderia prevenir ou reverter o efeito diabetogênico. Zanoello *et al*, discutiram sobre a capacidade protetiva da *Syzygium cumini* em proteger as células β do pâncreas a ação diabetogênica do aloxano, possivelmente pela presença de substância antioxidantes como eugenol, ácido gálico e taninos [93]. Em nosso trabalho, os animais diabéticos após o tratamento com *C. regium* por 7 dias, demonstraram uma redução da glicemia de jejum em relação aos animais do grupo controle.

Tivemos também inibição da AChE em animais que receberam o extrato de *C. regium*. Sabe-se que o SNC usa uma quantidade significativa de oxigênio e ATP, e defesas antioxidantes diminuídas em comparação com outros tecidos resultam em uma grande susceptibilidade ao estresse oxidativo [94]. Mehta et al 2017, relatam em seu estudo que o ácido elágico, pode ser tão eficaz no tratamento da neuropatia diabética quando comparados aos medicamentos de referência com bom efeito antidiabético e neuroprotetor [95].

5 CONCLUSÃO

No presente estudo demonstramos os efeitos promissores do extrato hidrometanólico das raízes do *C. regium* sobre a regulação da homeostase da glicose, em sua atividade antioxidante, em sua atividade anti-glicação, anticolinesterásica e efeitos benéficos sobre animais diabéticos induzidos com aloxano. O potencial anti-hiperglicêmico do extrato foi demonstrado pelos níveis de glicemia reduzida em ratos normoglicêmicos que receberam uma sobrecarga de glicose (4g/kg), em ratos diabéticos e ainda, redução dos triglicerídeos, em ratos que receberam uma dieta hiperglicídica por 14 semanas. Foi observado também que o extrato possui uma atividade antioxidante através o método do DPPH, ABTS, MDA e inibição da oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, inibindo também a formação de AGES no sistema *in vitro* BSA/Glicose e uma inibição sobre a enzima AChE. Estudos adicionais devem ser realizados sobre o papel do extrato de raízes do *C. regium* na prevenção do aumento dos níveis de hiperglicemia.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Nós declaramos que não temos conflito de interesse.

AGRADECIMENTOS

Ao capes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E.A.L.S.J.V.D.A.T.D.d.L.E.L.d.P.Z.N.M.L.C.B.I.d. Souza., AS PLANTAS MEDICINAIS E AS LEIS NA SAÚDE PÚBLICA, Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade, 2014.
- [2] W.H.O.-. WHO, General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, Geneva, 2000.
- [3] H.L.P. Matsuchita, A.S.P. Matsuchita, A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública, UNICIÊNCIAS 19(1) (2015).
- [4] R.L. SANTOS, G.P. GUIMARAES, M.S.D.C. NOBRE, A.D.S. PORTELA, Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 13(4) (2011) 486-491.
- [5] M.D.S.P. BRASIL, Ministério da Saúde destina mais de R\$ 1 milhão a projetos com plantas medicinais, 2016. (Accessed 13 - Abril 2017).
- [6] UNICEF, Cuidados Primários de Saúde-Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde-Alma-Ata, 1978, Brasília: UNICEF (1979).
- [7] M.D.S.-M.-. BRASIL, POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília, 2006.
- [8] A.N.D.V.S. ANVISA, Memento Fitoterápico Farmacopeia Brasileira, Brasília, 2016.
- [9] M.I. Kazeem, A.O.T. Ashafa, In-vitro antioxidant and antidiabetic potentials of *Dianthus basuticus* Burttt Davy whole plant extracts, Journal of Herbal Medicine 5(3) (2015) 158-164.
- [10] V.K.A.K.A.N.F.J.C. Aster, Patologia Bases Patológicas das Doenças, 8ª ed., Rio de Janeiro, 2010.
- [11] D.G.G.D. SHOBACK, Endocrinologia Básica e Clínica de Greenspan, 9ª ed., Porto Alegre, 2011.
- [12] A.C. Lopes, Tratado de Clínica Médica, 2ª ed., São Paulo, 2012.
- [13] M. Santos Neto, Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Antipirética do Extrato Hidroalcoólico Bruto de *Cochlospermum Regium* (Mart & Schrank) Pilger Em Ratos, (2009).
- [14] S.S.L.F.G.B.J.M.d. Siqueira, O Gênero *Cochlospermum* Kunth com Ênfase nos Aspectos Etnobotânicos, Farmacológicos, Toxicológicos e Químicos de *Cochlospermum Regium* (Mart. Et. Schr.) Pilger., Revista Brasileira de Farmácia 6 (3) (2009) 24.
- [15] J.M. BOAVIDA, Diabetes: uma emergência de saúde pública e de políticas da saúde, Revista Portuguesa de Saúde Pública 34(1) (2016) 1-2.
- [16] S.B.D.D. SBD, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2015-2016.
- [17] P. GIOVANNINI, M.-J.R. HOWES, S.E. EDWARDS, Medicinal plants used in the traditional management of diabetes and its sequelae in Central America: A review, Journal of Ethnopharmacology 184 (2016) 58-71.
- [18] I.D.F.-. FID, Atlas de la Diabetes de la FID, Bruxelas - Bélgica, 2015.
- [19] H.P.R.J.M.R.R.J.F.G. HENDERSON, Rang & Dale, Farmacologia, 8ª ed., Rio de Janeiro, 2016.
- [20] S. KUMAR, R. SINGH, N. VASUDEVA, S. SHARMA, Acute and chronic animal models for the evaluation of anti-diabetic agents, Cardiovascular Diabetology 11 (2012) 9-9.
- [21] V.K. RAMZI S. COTRAM, TUCKER COLLINS, Patologia Estrutural e Funcional, Rio de Janeiro, 2000.
- [22] S. SURYA, A.D. SALAM, D.V. TOMY, B. CARLA, R.A. KUMAR, C. SUNIL, Diabetes mellitus and medicinal plants-a review, Asian Pacific Journal of Tropical Disease 4(5) (2014) 337-347.
- [23] J.A. TODD, L.S. WICKER, Genetic Protection from the Inflammatory Disease Type 1 Diabetes in Humans and Animal Models, Immunity 15(3) 387-395.
- [24] E.C. CRUZ, A. ANDRADE-CETTO, Ethnopharmacological field study of the plants used to treat type 2 diabetes among the Cakchiquels in Guatemala, Journal of Ethnopharmacology 159 (2015) 238-244.
- [25] K. Nowotny, T. Jung, A. Hohn, D. Weber, T. Grune, Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus, Biomolecules 5(1) (2015) 194-222.

- [26] M.V. Antunes, C. Lazzaretti, G.D. Gamaro, R. Linden, Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 44 (2008) 279-287.
- [27] M.L.S. Negri, J.C. Possamai, T. Nakashima, Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19 (2009) 553-556.
- [28] M. ZEMESTANI, M. RAFRAF, M. ASGHARI-JAFARABADI, Chamomile tea improves glycemic indices and antioxidants status in patients with type 2 diabetes mellitus, *Nutrition* 32(1) (2016) 66-72.
- [29] P.S. AZEVEDO, D.R. DUARTE, M.F. MINICUCCI, B.B. MATSUBARA, L.S. MATSUBARA, R. NOVO, E.L. NOVELLI, Á.O. CAMPANA, S.A.R. PAIVA, L.A.M. ZORNOFF, Papel da lipoperoxidação na intensificação da remodelação causada pelo betacaroteno após o infarto, *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 93 (2009) 34-38.
- [30] P.R.B. BROINIZI, E.R.S.D. ANDRADE-WARTHA, A.M.D.O. SILVA, R.P. TORRES, H.M.C. AZEREDO, R.E. ALVES, J. MANCINI-FILHO, Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(4) (2008) 773-781.
- [31] A. GAUTIERI, F.S. PASSINI, U. SILVÁN, M. GUIZAR-SICAIROS, G. CARIMATI, P. VOLPI, M. MORETTI, H. SCHOENHUBER, A. REDAELLI, M. BERLI, J.G. SNEDEKER, Advanced glycation end-products: Mechanics of aged collagen from molecule to tissue, *Matrix Biology* (2017).
- [32] J.H.P.O. Barbosa, Suzana Lima de; Seara Luci Tojal Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. , *Brazilian Journal of Nutrition* 22 (2009) 113-124.
- [33] A. GOLDIN, J.A. BECKMAN, A.M. SCHMIDT, M.A. CREAGER, Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury, *Circulation* 114(6) (2006) 597-605.
- [34] C. LUEVANO-CONTRERAS, K. CHAPMAN-NOVAKOFSKI, Dietary advanced glycation end products and aging, *Nutrients* 2(12) (2010) 1247-65.
- [35] M.M. JOGLEKAR, L.N. BAVKAR, S. SISTLA, A.U. ARVINDEKAR, Effective inhibition of protein glycation by combinatorial usage of limonene and aminoguanidine through differential and synergistic mechanisms, *International Journal of Biological Macromolecules* 99 (2017) 563-569.
- [36] P. GUPTA, V. JAIN, A. PAREEK, P. KUMARI, R. SINGH, P. AGARWAL, V. SHARMA, Evaluation of effect of alcoholic extract of heartwood of *Pterocarpus marsupium* on in vitro antioxidant, anti-glycation, sorbitol accumulation and inhibition of aldose reductase activity, *Journal of Traditional and Complementary Medicine* (2016).
- [37] C.M. MAZZANTI, D.R. SCHOSSLER, A. FILAPPI, D. PRESTES, A.C. SILVA, M. CORREA, M.R.C. SCHETINGER, V.M. MORSCH, G. LUNKES, W.D.A. GONZAGA, M. CECIM, Efeito do extrato da casca de *Syzygium cumini* sobre a atividade da acetilcolinesterase em ratos normais e diabéticos, *Ciência Rural* 34 (2004) 803-807.
- [38] M.M.D. H. P. RANG, J. M. RITTER, R. J. FLOWER, Rang e Dale Farmacologia, 6 ed., Rio de Janeiro, 2008.
- [39] C.M.M. JAMILE FABBRIN GONÇALVES, ALEXSSANDRO, GEFERSON BECKER, ROSILENE RODRIGUEZ KAIZER, VANESSA BATTISTI, MAÍSA DE CARVALHO CORRÊA, PAULA ACOSTA MALDONADO, ROBERTA SCHMATZ, GUSTAVO ROBERTO THOMÉ, VERA MARIA MORSCH, MARIA ROSA CHITOLINA Schetinger., Oral administration of N-acetylcysteine improves biochemical parameters in diabetic rats, *Ciência e Natura UFSM* 34 (2012) 81-105.
- [40] É.C.M. NASCIMENTO, Determinação teórica de propriedades relevantes para a atividade de inibidor da acetilcolinesterase, (2009).
- [41] V.F.V.J.A.C. PINTO, PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA?, *Química Nova* 28 (2005).

- [42] J. CAMILO, Germinação e conservação de germoplasma de algodão-do-campo *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank.), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.
- [43] G. ARUMUGAM, P. MANJULA, N. PAARI, A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus, *Journal of Acute Disease* 2(3) (2013) 196-200.
- [44] M. TROJAN-RODRIGUES, T.L.S. ALVES, G.L.G. SOARES, M.R. RITTER, Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil, *Journal of Ethnopharmacology* 139(1) (2012) 155-163.
- [45] S. Sólton, Análises fitoquímica e farmacognóstica da raiz de *Cochlospermum reigum* (Mart. et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae., Program de de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília., Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- [46] M.N. Antunes, Constituintes Químicos de *Cochlospermum regium* (Martins e Schrank) Pilger (Bixaceae), Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, oferecido em associação entre a Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis., Universidade Católica de Goiás, 2009.
- [47] M.S. NETO, Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Antipirética do Extrato Hidroalcoólico Bruto de *Cochlospermum Regium* (Mart & Schrank) Pilger em Ratos, Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, oferecido numa associação entre a Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis., Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2009.
- [48] M.B.G. TROPICOS.ORG, 2017. (Accessed 14 e abril 2017).
- [49] R.K.F. Pilger, in: N.d.B.G.u.M.z. Berlim-Dahlem (Ed.) Berlim, 1924.
- [50] M.S. NETO, Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Antipirética do Extrato Hidroalcoólico Bruto de *Cochlospermum Regium* (Mart & Schrank) Pilger Em Ratos., Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis, Goiânia, 2009.
- [51] M.K.C.T. ABREU, Bixaceae, *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo* 2 (2002) 55-56.
- [52] M. Kirizawa, Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger-Cochlospermaceae, 1981.
- [53] K.T.J. DOS SANTOS, W.C. SILVA, H.F.V. TORQUATO, A.M. SELHORST, S. BESERRA, R.A.N. DOS SANTOS, I.F. DA SILVA JUNIOR, Abordagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Cochlospermum regium* em Diferentes Metodologias (Bioautografia, Disco-Difusão e Microdiluição), *UNICIÊNCIAS* 16(1) (2015).
- [54] M.I. Toledo, J.M. Siqueira, L.C. Araujo, S. Oga, Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) pilger, *Phytotherapy research : PTR* 14(5) (2000) 359-61.
- [55] M.C. INÁCIO, Estudo agrônômico, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (mart. ex. Scharank): uma planta medicinal do Cerrado, (2010).
- [56] A. MEDA, C.E. LAMIEN, M. ROMITO, J. MILLOGO, O.G. NACOULMA, Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chemistry* 91(3) (2005) 571-577.
- [57] J.-Y. LIN, C.-Y. TANG, Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation, *Food Chemistry* 101(1) (2007) 140-147.
- [58] E.D.R. MAXSON, L.W., Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain, *Cereal Chem.* 49 (1972) 719-729.
- [59] D. Gupta, R.K. Gupta, Bioprotective properties of Dragon's blood resin: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11(1) (2011) 13.

- [60] N.R. PELLEGRINI, ROBERTA; PROTEGGENTE, ANNA; PANNALA, ANANTH; YANG, MIN; RICE-EVANS, CATHERINE, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine* 26(9–10) (1999) 1231-1237.
- [61] M.R. Maria do Socorro, Ricardo Elesbão Alves, Edy Sousa de Brito, Selene Maia De Moraes, Caroline de Goes Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Diego Saura-Calixto, Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS, *Embrapa Agroindústria Tropical/Comunicado Técnico* (2007) 4.
- [62] C.K.H.C. Kapoor, Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables, *Journal of Food Science and Technology* 37 (2002) 153-161.
- [63] G.J. STOCKS J, SHARP RJ, ET AL., Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids, *Clin Scien Mol Med* 47 (1974) 215-222.
- [64] V.D. Kappel, L.H. Cazarolli, D.F. Pereira, B.G. Postal, F.A. Madoglio, Z.D.S. Buss, F.H. Reginatto, F.R.M.B. Silva, Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23 (2013) 706-715.
- [65] E.K. NADERALI, M.J. BROWN, L.C. PICKAVANCE, J.P. WILDING, P.J. DOYLE, G. WILLIAMS, Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols, *Clinical science (London, England : 1979)* 101(5) (2001) 499-506.
- [66] J.-Q. Zhao, Y.-M. Wang, Y.-L. Yang, Y. Zeng, L.-J. Mei, Y.-P. Shi, Y.-D. Tao, Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from “Liucha” (young leaves and shoots of *Sibiraea laevigata*), *Food Chemistry* 230 (2017) 117-124.
- [67] K. Tvette Inngjerdingen, N.g. Ballo, B.-Z. Zhang, K.E. Malterud, T.E. Michaelsen, D. Diallo, B. Smestad Paulsen, A comparison of bioactive aqueous extracts and polysaccharide fractions from roots of wild and cultivated *Cochlospermum tinctorium* A. Rich, *Phytochemistry* 93 (2013) 136-143.
- [68] J.C. Sánchez-Salgado, R.R. Ortiz-Andrade, F. Aguirre-Crespo, J. Vergara-Galicia, I. León-Rivera, S. Montes, R. Villalobos-Molina, S. Estrada-Soto, Hypoglycemic, vasorelaxant and hepatoprotective effects of *Cochlospermum vitifolium* (Willd.) Sprengel: A potential agent for the treatment of metabolic syndrome, *Journal of Ethnopharmacology* 109(3) (2007) 400-405.
- [69] M.T. Yakubu, M.A. Akanji, M.O. Nafiu, Article original Pharmacology Anti-diabetic activity of aqueous extract of *Cochlospermum planchonii* root in alloxan-induced diabetic rats, *Cameroon Journal of Experimental Biology* 6(02) (2010) 91-100.
- [70] Z. Guo, X. Niu, T. Xiao, J. Lu, W. Li, Y. Zhao, Chemical profile and inhibition of α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activities by flavonoids from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), *Journal of Functional Foods* 14 (2015) 324-336.
- [71] T.O. Jimoh, Enzymes inhibitory and radical scavenging potentials of two selected tropical vegetable (*Moringa oleifera* and *Telfairia occidentalis*) leaves relevant to type 2 diabetes mellitus, *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2017).
- [72] V.R. Punithavathi, P.S.M. Prince, R. Kumar, J. Selvakumari, Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats, *European Journal of Pharmacology* 650(1) (2011) 465-471.
- [73] E. Kyriakis, G.A. Stravodimos, A.L. Kantsadi, D.S.M. Chatzileontiadou, V.T. Skamnaki, D.D. Leonidas, Natural flavonoids as antidiabetic agents. The binding of gallic and ellagic acids to glycogen phosphorylase b, *FEBS Letters* 589(15) (2015) 1787-1794.
- [74] M. Bahmani, H. Golshahi, K. Saki, M. Rafieian-Kopaei, B. Delfan, T. Mohammadi, Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, Supplement 2 (2014) S687-S692.
- [75] S. Adisakwattana, T. Thilavech, W. Sompong, P. Pasukamonset, Interaction between ascorbic acid and gallic acid in a model of fructose-mediated protein glycation and oxidation, *Electronic Journal of Biotechnology* 27 (2017) 32-36.

- [76] Y. Wang, J. Wang, Y. Zhao, S. Hu, D. Shi, C. Xue, Fucoidan from sea cucumber *Cucumaria frondosa* exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121(1) (2016) 36-42.
- [77] S.A.K. Jongkees, S. Caner, C. Tysoe, G.D. Brayer, S.G. Withers, H. Suga, Rapid Discovery of Potent and Selective Glycosidase-Inhibiting De Novo Peptides, *Cell Chemical Biology* 24(3) (2017) 381-390.
- [78] V.M. Kasture, N.B. Kalamkar, R.J. Nair, R.S. Joshi, S.G. Sabharwal, D.D. Dhavale, Synthesis, conformational study, glycosidase inhibitory activity and molecular docking studies of dihydroxylated 4- and 5-amino-iminosugars, *Carbohydrate Research* 408 (2015) 25-32.
- [79] H. Taghzouti, S. Goumain, D. Harakat, C. Portella, J.-B. Behr, R. Plantier-Royon, Synthesis of 2-carboxymethyl polyhydroxyazepanes and their evaluation as glycosidase inhibitors, *Bioorganic Chemistry* 58 (2015) 11-17.
- [80] H. Ren, Q.-L. Xu, M. Zhang, L.-M. Dong, Q. Zhang, B. Luo, Q.-W. Luo, J.-W. Tan, Bioactive caffeic acid derivatives from *Wedelia trilobata*, *Phytochemistry Letters* 19 (2017) 18-22.
- [81] H. Cho, Chapter Seventeen - Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) and Obesity, in: L. Gerald (Ed.), *Vitamins & Hormones*, Academic Press 2013, pp. 405-424.
- [82] M.T.-P. Rolffy Ortiz - Andrade, Juan Carlos Sánchez-Salgado, Sara García-Jiménez, Rafael Villalobos-Molina, Maximiliano Ibarra-Barajas, Itzell Gallardo - Ortiz E Samuel, Estrada-Soto, Acute and Sub-Chronic Effects Of *Cochlospermum vitifolium* In Blood Glucose Levels In Normoglycemic And Stz-Nicotinamide-Induced Diabetic Rats, *Revista Latinoamericana de Química* 37 (2009).
- [83] K. Hanhineva, R. Torronen, I. Bondia-Pons, J. Pekkinen, M. Kolehmainen, H. Mykkanen, K. Poutanen, Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism, *International journal of molecular sciences* 11(4) (2010) 1365-402.
- [84] P. Yin, L. Yang, Q. Xue, M. Yu, F. Yao, L. Sun, Y. Liu, Identification and inhibitory activities of ellagic acid- and kaempferol-derivatives from Mongolian oak cups against α -glucosidase, α -amylase and protein glycation linked to type II diabetes and its complications and their influence on HepG2 cells' viability, *Arabian Journal of Chemistry* (2017).
- [85] G. Oboh, O.B. Ogunsuyi, M.D. Ogunbadejo, S.A. Adefegha, Influence of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of acarbose, *Journal of Food and Drug Analysis* 24(3) (2016) 627-634.
- [86] G.R. Gandhi, G. Jothi, P.J. Antony, K. Balakrishna, M.G. Paulraj, S. Ignacimuthu, A. Stalin, N.A. Al-Dhabi, Gallic acid attenuates high-fat diet fed-streptozotocin-induced insulin resistance via partial agonism of PPAR γ in experimental type 2 diabetic rats and enhances glucose uptake through translocation and activation of GLUT4 in PI3K/p-Akt signaling pathway, *European Journal of Pharmacology* 745 (2014) 201-216.
- [87] K.M. Kim, K.-S. Lee, G.Y. Lee, H. Jin, E.S. Durrance, H.S. Park, S.H. Choi, K.S. Park, Y.-B. Kim, H.C. Jang, S. Lim, Anti-diabetic efficacy of KICG1338, a novel glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, and its molecular characterization in animal models of type 2 diabetes and insulin resistance, *Molecular and Cellular Endocrinology* 409 (2015) 1-10.
- [88] X. Jiang, P. Zhang, S. Li, X. Tan, Z. Hu, B. Deng, K. Wang, C. Li, M.A. Sullivan, E. Li, R.G. Gilbert, Molecular-size dependence of glycogen enzymatic degradation and its importance for diabetes, *European Polymer Journal* 82 (2016) 175-180.
- [89] R.P. Nankar, M. Doble, Hybrid drug combination: Anti-diabetic treatment of type 2 diabetic Wistar rats with combination of ellagic acid and pioglitazone, *Phytomedicine* 37 (2017) 4-9.
- [90] O. Karimi-Khouzani, E. Heidarian, S.A. Amini, Anti-inflammatory and ameliorative effects of gallic acid on fluoxetine-induced oxidative stress and liver damage in rats, *Pharmacological Reports* 69(4) (2017) 830-835.
- [91] D.-W. Huang, W.-C. Chang, J.S.-B. Wu, R.-W. Shih, S.-C. Shen, Gallic acid ameliorates hyperglycemia and improves hepatic carbohydrate metabolism in rats fed a high-fructose diet, *Nutrition Research* 36(2) (2016) 150-160.

- [92] I.F. Federiuk, H.M. Casey, M.J. Quinn, M.D. Wood, W.K. Ward, Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment, *Comparative medicine* 54(3) (2004) 252-7.
- [93] C.M.-M. Andréia Maria Zanoelo, Jéssica Kerpel Gindri, Andreane Filappi, Danívia Prestes e Marcelo Cecim, Efeito Protetor do *Syzygium cumini* contra Diabetes Mellitus induzidos por Aloxano em Ratos, *Acta Farm. Bonaerense* 21 (2002).
- [94] Z. Madani, W.J. Malaisse, D. Ait-Yahia, A comparison between the impact of two types of dietary protein on brain glucose concentrations and oxidative stress in high fructose-induced metabolic syndrome rats, *Biomedical reports* 3(5) (2015) 731-735.
- [95] V. Mehta, P. Verma, N. Sharma, A. Sharma, A. Thakur, U. Malairaman, Quercetin, ascorbic acid, caffeine and ellagic acid are more efficient than rosiglitazone, metformin and glimepiride in interfering with pathways leading to the development of neurological complications associated with diabetes: A comparative in-vitro study, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University* 55(1) (2017) 115-121.