



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO ANTIDIABÉTICO E HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO
ETANÓLICO BRUTO DE *Spondias tuberosa* ARRUDA EM RATOS**

AUTOR:
HUMBERTO DE MOURA BARBOSA

ORIENTADOR
EDUARDO CARVALHO LIRA

COORIENTADOR (A)
DAYANE APARECIDA GOMES

RECIFE, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO ANTIDIABÉTICO E HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO
ETANÓLICO BRUTO DE *Spondias tuberosa* ARRUDA EM RATOS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

AUTOR:
HUMBERTO DE MOURA BARBOSA

RECIFE, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Barbosa, Humberto de Moura

Efeito antidiabético e hipolipidêmico do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* Arruda em ratos. / Recife: O Autor, 2016.

64 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Eduardo Carvalho Lira

Coorientadora: Dayane Aparecida Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2016.

Inclui referências e anexo

- 1. Diabetes 2. Umbuzeiro (planta) 3. Hipoglicemia I. Lira,
Eduardo Carvalho (orient.) II. Gomes, Dayane Aparecida (coorient.)
III. Título**

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 560

HUMBERTO DE MOURA BARBOSA

**EFEITO ANTIDIABÉTICO E HIPOLIPIDÊMICO DO EXTRATO
ETANÓLICO BRUTO DE *Spondias tuberosa* ARRUDA EM RATOS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado em 31 de agosto de 2016

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE
Orientador

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE
Titular Interno 1

Profa. Dra. Valéria Nunes Souza
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE
Titular Interno 2

Prof. Dr. Bruno de Melo Carvalho
Instituto de Ciências Biológicas – UPE
Titular Externo 1

Aos meus pais, Berenides M. Barbosa e Izaías de Menezes Barbosa.

Aos meus amores, Geisiane Barbosa (esposa) e Iago Barbosa (filho).

Ao meu irmão, Héberton M. Barbosa.

Aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por está sempre presente em todos os momentos, principalmente nesta jornada de minha vida, onde nos altos e baixos, idas e vindas, saudades, tristezas, alegrias, erros e aprendizado, me fortaleceu e permitiu que eu chegasse até aqui, tornando possível mais uma conquista pessoal e profissional.

Aos meus queridos e amados pais, Painho e Mainha, pelo total apoio em minhas escolhas e decisões, pelo amor, carinho, cobranças e ensinamentos que me ajudaram a ser quem sou e onde estou hoje. Serei eternamente grato por toda dedicação e de abdições em momentos de suas vidas para tornar a vida de seus filhos melhor. Vocês estarão sempre à frente de minhas conquistas, obrigados por me ensinarem desde cedo a perseguir meus sonhos. Os amarei eternamente...

A minha esposa, Geisiane Barbosa, por todo amor e carinho, pela dedicação e compreensão de minhas ausências, pelo “nosso tempo” reduzido que me foi cobrado durante este processo, e por fazer dos “pequenos e poucos” momentos que nos foi oportunizado, vivíamos intensamente. Obrigado pela mulher e mãe que és, por não me deixar desistir e apoiar em minhas escolhas e decisões, dividindo comigo todas as alegrias e dificuldades que encontrei pelo caminho, sendo meu porto seguro e meu colo nos momentos de fraqueza. Minha eterna “princesinha”...

Ao meu pequeno e amado filho, Iago Barbosa, que foi gerado durante essa minha jornada, e que por muitas vezes precisei me ausentar do convívio em prol desse sonho. Não tenho palavras para expressar o quanto você mudou minha vida... Nada melhor que após uma longa jornada de um dia de trabalho exaustivo, com experimentos longos que muitas vezes não davam certo, chegar em casa e encontrar você com seu sorriso correndo para me abraçar e dizer “pápátxi” ...aaa...aaa... me pedindo para te colocar em meus braços, restaurava todas minhas energias para enfrentar mais um novo dia. Hoje você aprendeu a pedir para eu não ir trabalhar... Papai, papai... não... não... e falo: de quem é a culpa de papai ir trabalhar? Você responde: “Dudu”... kkk morro de rir, e volto correndo para lhe dar um abraço e um beijo, mas felizmente você aprendeu a chorar, pela minha ausência...e saio para trabalhar com os olhos em lágrimas. Amo-te meu filho... um dia você entenderá minha ausência...

Ao Professor Doutor Eduardo Lira, meu orientador, que em sua busca permanente pelo conhecimento e pela pesquisa experimental, sempre acreditou em meu potencial, mesmo quando eu não acreditava, conduziu meus primeiros passos como pesquisador. Seus ensinamentos, cobranças, questionamentos em nossas reuniões científicas ou até mesmo em um intervalo entre um experimento e outro, me ensinou a ver a ciência com outros olhos. Seu cuidado, dedicação e preocupação com a nossa formação profissional, deixando claro que a “publicação” é importante, mas o ser humano em formação perpassa tudo isso. Dificuldades e novos desafios sempre existirão, contudo sempre serão vencidos com o trabalho árduo em equipe. Apesar de tudo passar tão rápido e tão intenso, sempre me questiono! Quem eu era e o que me tornei? Serei eternamente grato a você por tudo... pela incansável frase quando algo dava errado: “faz parte do aprendizado”. Por fim, e o mais importante de tudo: se esse é o seu sonho, nunca desistir quando as coisas parecerem difíceis.

A Professora Doutora Dayane Gomes, minha coorientadora, pelo exemplo de organização, pela grande orientadora científica sempre prontamente disponível para ajudar, por isso...“mãezona” como todos falam! Obrigado pelo incentivo, dedicação e amizade a mim depositada. Seus ensinamentos sempre pontuais foram muito importantes nessa jornada.

Ao meu amigo e irmão, Ivanildo Junior, por todo o companheirismo, dedicação, humildade, paciência em suportar minhas inseguranças, e sempre disponível para ensinar, sem contar na ajuda nas longas dosagens de glicogênio. Nunca vou esquecer dos nossos almoços e lanches onde aproveitávamos pra falar de outras coisas que não ciência, mas no fim terminava nela. Seu auxílio na minha formação foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Você faz parte dessa conquista e serei eternamente grato por tudo.

Ao grande amigo e irmão, Jailson Nunes, “my great Doctor”... Nunca errou uma, e olha que ele está em formação...por todos os momentos vividos, pelas longas e incansáveis 05:30...que passaram, e como foi rápido, e o que nos sobrou? o aprendizado! Obrigado pelo ombro amigo, pelo incentivo, sempre mostrando que nunca devemos nos importar com o que os outros pensam de você, e sim o que somos, e onde queremos chegar! Chegamos... Que todos os seus sonhos sejam realizados, pois você é merecedor, Deus abençoe todos os seus caminhos.

A eterna amiga, Doutora Djanah C. Machado, uma Irmã que ganhei, por toda a dedicação, pelos momentos de cobranças, pelos momentos de felicidades, quando podíamos lanchar juntos, pela paciência para ensinar, enfim, por todo o carinho e pela total colaboração cujo auxílio foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Você também faz parte dessa conquista. Você mora em meu coração.

Ao Professor, Doutor Thiago Caruaru, do Laboratório de Etnobotânica Aplicada, por produzir e ceder o extrato de *Spondias tuberosa*, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado.

A todos que fizeram e fazem parte do Laboratório de Neuroendocrinologia e Metabolismo – LNE, Amanda, Flávia, Thaís, Alicia, July, Marília, Sheyla, Joaquim, Junior, Flavio, Kelly, Suellen, Allison, o mais novo mestrando, Dionísio, direta ou indiretamente vocês puderam contribuir para minha formação, e acima de tudo, foram as amizades conquistadas. Um forte abraço!

Ao amigo Breno Bormann, pela confiança a mim depositada, onde pude me descobrir Professor... pelas longas conversas sobre ciência, e como você sempre fala tudo é uma “troca” já lhe disse: vá estudar.... “Foi bem cedo na vida que eu procurei, Encontrar novos rumos num mundo melhor, Com você fique certo que jamais falhei, Pois ganhei muita força tornando maior... A amizade... La laiá, la laiá!

Não poderia deixar de citar minha grande amiga, eterna irmã e comadre, Pricylla Alves, que apesar da distância e de nossas vidas corridas sempre se fez presente. Obrigado pelo total apoio, incentivo e por acreditar em meu potencial nessa minha longa jornada.

Aos demais amigos do Departamento, em especial, Marina Séfora, Heloisa Mirelle, Luciano, Hemerson, Jaíro, Edjair, Marcelo, e o grande Professor Doutor Leucio. Por todos os pequenos momentos em que pudemos parar um pouco nessa nossa correria, desabafar nossas insatisfações, falar de nossas inseguranças, para discutirmos ciência, mas também para incentivarmos uns aos outros quando muitas vezes não queríamos estar ali. Cada um sabe a amizade e carinho por mim dedicado. Desejo sucesso a todos.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Pró-Reitoria Para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) e a Pró-Reitoria de Planejamento, Orçamento e Finanças (PROPLAN) pelo auxílio financeiro dedicado a presente pesquisa, sem a qual a mesma não se realizaria.

“É o que nós pensamos que sabemos que nos impede de aprender”.

Claude Bernard

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um dos principais distúrbios metabólicos que afeta, atualmente, 415 milhões de pessoas no mundo, com perspectiva deste número atingir cerca de 640 milhões em 2040. É caracterizado pela hiperglicemia resultante da deficiência da produção e/ou resistência à insulina, cuja progressão é complexa e envolve diferentes fatores, como a inflamação e o intenso estresse oxidativo, que estão diretamente associados ao aumento das comorbidades diabéticas e alta mortalidade dos pacientes. Infelizmente, a terapia farmacológica atualmente empregada é limitada por seus efeitos adversos e sua ineficiência na prevenção das complicações do DM, como a dislipidemia e as doenças cardiovasculares, o que tem motivado o desenvolvimento de novos agentes hipoglicemiantes. Neste contexto, o uso de produtos naturais como fonte para obtenção de novas alternativas terapêuticas para o combate ao DM e suas comorbidades é estratégico. Dentre estas espécies, a *Spondia tuberosa* Arruda, Anacardiaceae, popularmente conhecida como umbu, é uma espécie nativa da Caatinga, endêmica do semiárido brasileiro utilizada como alimento, fonte de renda e na medicina popular, no tratamento de diferentes patologias, dentre elas diabetes. Diante desse contexto, os possíveis efeitos antidiabético e hipolipemiante do extrato etanólico bruto da casca de *Spondias tuberosa* (EEBStc) foram investigados em ratos. O DM foi induzido por estreptozotocina (STZ, 40mg/Kg, i.v.) em ratos Wistar machos (~180g). Após a confirmação do diabetes, os animais foram tratados por via oral durante 21 dias com o EEBStc (250 e 500mg/Kg, v.o.). Parâmetros metabólicos e bioquímicos foram analisados diariamente e ao final do período experimental. O tratamento com o EEBStc (500mg/kg) reduziu a hiperglicemia, assim como a poliúria, polidipsia, polifagia, a perda ponderal, a diurese, a excreção urinária de glicose e ureia, bem como reduziu processos catabólicos (proteólise e lipólise) em ratos diabéticos. Além disso, atenuou a hipertrigliceridemia e os elevados índices de VLDL e a hepatotoxicidade em ratos diabéticos. O grupo tratado com EEBStc (500mg/Kg) também melhorou a tolerância oral à glicose e o conteúdo de glicogênio hepático em ratos diabéticos. Portanto, o presente estudo sugere que o tratamento com o EEBStc, pode exercer efeitos antidiabético, hipolipemiante e hepatoprotetor em ratos.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, estreptozotocina, hipoglicemiante.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is one of the most common metabolic disorders affecting currently 415 million people worldwide, with perspective of this number reaches about 642 million in 2040. The progression of diabetes is complex and involves different factors, such as inflammation and the intense oxidative stress, which are directly associated with the increase of comorbidity and mortality of diabetic patient. Unfortunately, drug therapy currently used is limited by its side effects and their ineffectiveness in preventing the diabetes comorbidities, such as dyslipidemia and cardiovascular disease, which has motivated the development of new hypoglycemic agents. In this context, the use of natural products as a source for obtaining new molecules to treat diabetes and its comorbidities is strategic. *Spondias tuberosa*, popularly knowing as umbu, is native from savanna-like vegetation and widely used for medicinal purposes, including totreat several diseases, including diabetes. The aim of this study was evaluated the antidiabetic and hypolipemiant effect of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark (EEBStc) in rats. Normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats were treated orally with 250 or 500 mg/kg body weight of EEBStc for 21 days. EEBStc (500 mg/kg/day) promoted reduction fasting and post prandial glycaemia, urinary urea and glucose, polyphagia, polyuria, polydipsia, as well as reduced catabolic processes (lipolysis and proteolysis) in diabetic rats. In addition, EEBStc improved oral glucose tolerance and decreased triglycerides and VLDL serum levels, as well as hepatotoxicity when compared to the diabetic control rats. Furthermore, EEBStc showed the hepatoprotective effect in diabetic rats. Through the anti-diabetic, hypolipemiant and hepatoprotective effect of the EEBStc, this specie represents a possible dietary adjunct for the treatment of diabetes.

Key-words: Diabetes *mellitus*, Streptozotocin, hepatoprotective, hypoglycemic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Recomendações da Organização Mundial de Saúde para critérios de diagnóstico do diabetes e hiperglicemia (IDF, 2015).....	18
Figura 2 – Classificação da Organização Mundial de Saúde de hiperglicemia na gestação (IDF, 2005).....	19
Figura 3 – Efeitos tóxicos da estreptozotocina e da aloxona em células beta pancreáticas em modelo de diabetes experimental.....	20
Figura 4 – Estrutura química da Estreptozotocina (LENZEN, 2008).....	20
Figura 5 – Mecanismo de ação da estreptozotocina (VAREDA, 2013).....	21
Tabela 1 – Medicamentos antidiabéticos (ADOLFO,2016).....	25
Figura 6 – <i>Spondias tuberosa</i> (umbu).....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

apoB48 – Apoproteína B48
AGL – Ácido graxo livre
ALX – Aloxana
ATP – Adenosina trifosfato
BB – Biobreading
 β – Beta
EDL - Extensor longo dos dedos
EEBStc – Extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa*
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DM – Diabetes *mellitus*
DM1 – Diabetes *mellitus* Tipo 1
DM2 – Diabetes *mellitus* Tipo 2
DMG – Diabetes Gestacional
GLUT2 – Transportador de glicose, isoforma 2
HDL-C – Lipoproteínas de alta densidade
HPL – Lactogênio placentário humano
IL-6 – Interleucina 6
i.v. - Intravascular
IDF – Federação Internacional de Diabetes
LDL – Lipoproteínas de baixa densidade
LPL – Lipase lipoproteica
NAD – Nicotina adenina dinucleotídeo
NOD – *Non Obese Diabetic*
OMS – Organização Mundial de Saúde
STZ – Streptozotocina
TG – Triglicérides
TOTG – Teste de tolerância oral a glicose
VLDL-C – Lipoproteína de muito baixa densidade
V.O. – Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 FUNDAIMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Diabetes <i>mellitus</i>	17
2.2 Diabetes experimental.....	19
2.3 Hiperglicemia e dislipidemia diabética.....	22
2.4 Plantas medicinais e diabetes.....	23
2.5 <i>Spondias tuberosa</i>	25
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 GERAL.....	28
3.2 ESPECÍFICOS.....	28
4 CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A - Efeito anti-diabético e anti-hiperlipidêmico do extrato etanólico bruto de <i>spondias tuberosa</i> arruda em ratos.....	37
ANEXO B - Acute toxicity and cytotoxicity effect of ethanolic extract of <i>Spondias tuberosa</i> arruda bark- hematological, biochemical and histopathological evaluation.....	55
ANEXO C - Parecer da comissão de ética no uso de animais.....	67

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) representa um dos maiores desafios à medicina no século 21 por representar um grave problema de saúde pública com grande impacto social e econômico. A cada 11 adultos, 1 é diabético, o que representa 12% do gasto total com saúde no mundo, alcançando a ordem de 673 bilhões de dólares/ano para o tratamento e a prevenção do DM e suas comorbidades refletidas na redução da qualidade de vida e morte prematura. (SOMANI et al, 2006; IDF, 2015). O Brasil ocupa a 4ª posição entre os países com maior prevalência de DM, com cerca de 14,3 milhões de diabéticos e gastos na ordem de 14,3 milhões de dólares no tratamento do DM e suas comorbidades (IDF, 2015). Atualmente, metade dos pacientes diabéticos desconhece que são portadores desta patologia (IDF, 2015).

Diferentes razões explicam o aumento na prevalência do DM no mundo, tais como sedentarismo, envelhecimento, obesidade, bem como da maior sobrevida de pacientes com DM (DIRETRIZES, SBD, 2016). Diante disso, os esforços na prevenção e no tratamento do DM são globais, sobretudo no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que previnam as comorbidades diabéticas, a melhora da expectativa e da qualidade de vida do paciente diabético.

Apesar das atuais alternativas de tratamento, que incluem a modificação de hábitos de vida (dieta e exercício físico) e terapia farmacológica com o uso de hipoglicemiantes orais ou insulina exógena, o controle glicêmico é limitado pela baixa adesão dos pacientes aos programas de modificação de estilo de vida ou pelos efeitos colaterais dos fármacos (COHEN & HORTON, 2007; DEROSA & SIBILLA, 2007; XU et al., 2014). Diante disso, é justificado o interesse da comunidade científica investigar extratos vegetais como fonte de novas moléculas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o controle glicêmico eficiente em longo prazo e a prevenção das comorbidades diabéticas, o que melhora a expectativa e a qualidade de vida de pacientes diabéticos.

Estudos etnobotânicos têm identificado plantas candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes patologias, inclusive o DM, a partir do uso popular por comunidades tradicionais (LIMA et al., 2010). Estima-se que cerca de três quartos da população mundial utiliza plantas

medicinais para sanar necessidades básicas de saúde (LIRA et al., 2005; PANDEY et al., 2013). Atualmente, o Brasil ocupa a 10ª posição na lista de consumidores mundiais de plantas medicinais (OLIVEIRA et al., 2012), por diferentes razões, dentre elas a biodiversidade, atividade biológica demonstrada, baixo custo para o paciente e reduzido efeito adverso ou tóxico (LIMA et al., 2013). Considerando que o Brasil detém uma das maiores biodiversidades do mundo, o conhecimento de sua flora e princípios bioativos é estratégico para o desenvolvimento econômico do país, a preservação do patrimônio botânico e para a saúde pública.

Dentre as espécies nativas da caatinga, a *Spondia tuberosa* Arruda (Família Anacardiaceae), popularmente conhecida como (umbu ou imbu) é amplamente utilizada como alimento (LORENZI, 2002) Além disso, também é utilizada com finalidades terapêuticas, inclusive no combate a alterações metabólicas importantes como as dislipidemias, inflamações, distúrbios gastrointestinais e diabetes (LINS NETO et al. 2010; DA SILVA SIQUEIRA et al., 2016).

Análises fitoquímicas desta espécie têm mostrado altos teores de compostos fenólicos (MELO & ANDRADE, 2010), assim como intensa atividade antioxidante (GREGORIS et al., 2013), características que a torna uma candidata natural à avaliação do efeito antidiabético em ratos. Deste modo, propomos avaliar o efeito antidiabético e hipolipemiante de *S. tuberosa* em ratos normas e diabéticos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Diabetes *mellitus*

Conceitualmente, o DM é uma grave e complexa desordem metabólica, congênita ou adquirida, caracterizada por distúrbios no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas decorrente de prejuízos na secreção e/ou na ação da insulina em tecidos periféricos (DESHPANDE et al., 2008; BAVILONI et al., 2010). É classificado em dois diferentes subtipos principais: tipo 1 e tipo 2. O DM tipo 1 (dependente de insulina) é de natureza autoimune caracterizado pela destruição das células β -pancreáticas o que gera uma deficiência absoluta de insulina (KAWASHITA & BAVIERA, 2010), cujos sintomas evidentes, além da hiperglicemia, são a poliúria, polidipsia, desidratação e perda rápida de massa corporal. A prevalência deste tipo de DM é baixa, em torno de 5 a 10% dos pacientes diagnosticados na infância, adolescência e idade adulta (KAWASHITA & BAVIERA, 2010).

O DM1 pode ser dividido em tipo 1A (autoimune), cuja fisiopatologia envolve a destruição imunomediada de células β -pancreáticas com consequente deficiência de insulina (BIBBÒ, et al. 2016). O tipo 1B (idiopático) não há uma etiologia conhecida para essa forma de diabetes. Corresponde a minoria dos casos de DM1 e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células beta (DIRETRIZES, SBD, 2016). Como resultado da incapacidade das células β -pancreáticas produzirem insulina, os pacientes se tornam dependentes do uso de insulina exógena como principal alternativa para o controle glicêmico (IDF, 2015).

O DM tipo 2 (DM2) atinge em torno de 90 a 95% dos pacientes diagnosticados e está diretamente relacionado a fatores ambientais e estilo de vida (DESHPANDE et al., 2008). É caracterizada pela hiperglicemia decorrente da resistência insulínica periférica, particularmente no músculo esquelético e tecido adiposo, assim como da secreção deficiente de insulina pelo pâncreas e aumento da produção hepática de glicose, decorrente da resistência hepática à insulina (KAWASHITA & BAVIERA, 2010). O DM2 é uma doença crônica, multifatorial e progressiva (PANIGRAHI; PANDA; PATRA; 2016), e está diretamente relacionado a fatores ambientais e estilo de vida (DESHPANDE et al., 2008).

Embora existam alterações nos níveis glicêmicos transitórios, decorrentes do uso de fármacos, como corticoides sintéticos, o diagnóstico do DM se baseia em critérios claros que envolvem a hiperglicemia mantida e/ou alterações na tolerância oral à glicose.

Diabetes pode ser diagnosticado se um ou mais dos critérios forem adotados:

- Glicose plasmática de jejum $\geq$ (126mg/dl)
- Glicose plasmática após duas horas da ingestão de 75g de glicose $\geq$ (200mg/dl)

Tolerância à glicose diminuída pode ser diagnosticada se ambos os critérios forem adotados:

- Glicose plasmática de jejum $<$ (126mg/dl)
- Glicose plasmática após duas horas da ingestão de 75g de glicose (140 – 200mg/dl)

Glicose de jejum alterada pode ser diagnosticada se ambos os critérios forem adotados:

- Glicose plasmática de jejum (110 – 125mg/dl)
- Glicose plasmática após duas horas da ingestão de 75g de glicose (140mg/dl)

Figura 1 - Recomendações da Organização Mundial da Saúde para critérios de diagnóstico do diabetes e hiperglicemia, Adaptado de IDF, 2015

O diabetes gestacional (DMG) é o distúrbio metabólico de maior prevalência durante a gravidez (SANTANGELO et al., 2016). É entendido como intolerância à glicose e resistência à insulina, com início ou diagnóstico durante a gestação, sobretudo no terceiro trimestre gestacional (YUEN & WONG, 2015). É um quadro complexo decorrente de alterações endócrinas e metabólicas, incluindo a resistência à insulina fisiológica característica deste período como mecanismo para o fornecimento de maior aporte nutricional ao feto em desenvolvimento, a qual normalmente é normalizada no período perinatal (SONAGRA et al., 2014; CHEN et al., 2014). O DMG representa um período de importantes alterações endócrinas que envolvem a participação de hormônios diabetogênicos, normalmente secretados pela placenta, como o lactogênio placentário humano (HPL). Além de outros hormônios como o cortisol, estrógenos, progesterona e prolactina em níveis elevados, os quais reduzem a sensibilidade à insulina, bem como o aumento da ingestão calórica e aumento do peso corporal (GOLBERT & CAMPOS, 2008; SILVA et al., 2016).

O DMG ocorre de 1 a 14% das gestações, e relaciona-se diretamente com o aumento das comorbidades e mortalidade perinatais (COLBERG et al., 2013). Em geral, os riscos específicos do DMG não controlado incluem aborto espontâneo, anomalias fetais, pré-eclâmpsia, morte fetal intrauterino, macrossomia, hipoglicemia neonatal e hiperbilirrubinemia neonata (CHEN et al., 2014; YEUN & WONG, 2015;

SANTANGELO et al., 2016), razão pela qual o diagnóstico é baseado em critério bem definidos.

Diabetes *mellitus* gestacional pode ser diagnosticada em qualquer momento da gestação se um ou mais dos critérios forem adotados:

- Glicose plasmática de jejum (92 – 125mg/dl)
- Glicose plasmática após uma hora da ingestão de 75g de glicose $\geq$ (180mg/dl)
- Glicose plasmática após duas horas da ingestão de 75g de glicose $\geq$ (153 – 159mg/dl)

Diabetes gestacional pode ser diagnosticada se ambos os critérios forem adotados:

- Glicose plasmática de jejum $\geq$ (126mg/dl)
- Glicose plasmática após duas horas da ingestão de 75g de glicose $\geq$ (200mg/dl)
- Glicose plasmática casual $\geq$ (200mg/dl)

Figura 2 – Classificação da Organização Mundial de Saúde de hiperglicemia na gestação, Adaptado de IDF, 2015

2.2 Diabetes experimental

O estudo do DM e suas comorbidades tem se baseado em diferentes modelos experimentais, os quais têm permitido a melhor compreensão da fisiopatologia do DM (LENZEN, et al., 2008). Os modelos mais comumente utilizados são os genéticos, a ingestão de dieta hiperlipídica e os farmacológicos (WHITE, et al. 2013). Linhagens de animais que desenvolvem DM espontaneamente como ratos BB (*biobreading*), que usualmente se tornam diabéticos após a puberdade, em torno de 8 a 16 semanas de idade ou camundongos *non obes* (NOD) os quais desenvolvem diabetes tipo I por destruição autoimune das células β -pancreáticas (SOCARRÁS, 2014). Também são bem descritos os modelos induzidos por dieta hiperlipídica que desenvolvem obesidade, hiperinsulinemia e resistência à insulina (KIRSTEN, et al. 2010; SANTOS, et al. 2012). Os modelos farmacológicos clássicos envolvem o uso de drogas diabetogênicas como a aloxana (ALX) e a estreptozotocina (STZ), capazes de reproduzir no animal o quadro diabético clássico visto em humanos caracterizado pela hiperglicemia, glicosúria, polifagia, polidipsia e hiperglicemia (KIRSTEN, et al. 2010).

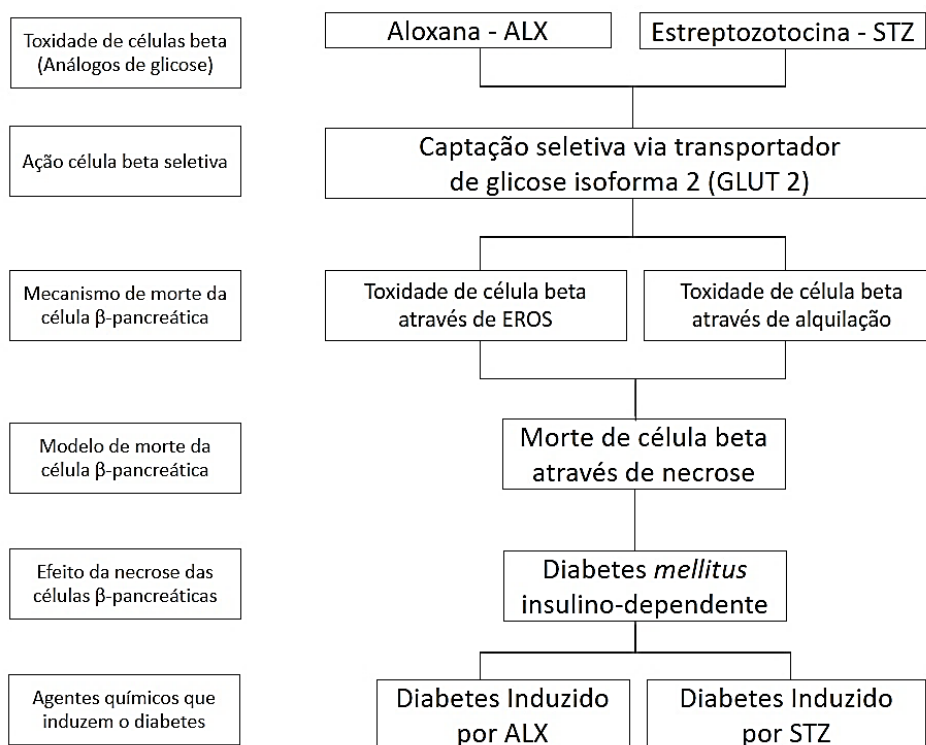


Figura 3. Representação esquemática dos efeitos tóxicos da estreptozotocina e da aloxona em células beta pancreáticas em modelo de diabetes experimental (LENZEN, 2008)

Neste trabalho o modelo utilizado foi o DM induzido pela STZ por representar uma condição semelhante à clínica, relativamente acessível e reprodutível para as condições experimentais.

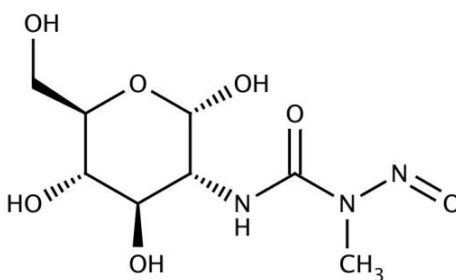


Figura 4 - Estrutura química da STZ. (LENZEN, 2008)

A STZ quimicamente é um glicosídeo análogo a metilnitrosuréia natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes* capaz de inibir a síntese de insulina (LENZEN, 2008). É uma molécula análoga à glicose que apresenta efeito citotóxico direto às células β -pancreáticas. É transportada para o meio intracelular através do

transportador de glicose, isoforma 2 (GLUT2), onde induz reações de alquilação responsável pela fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA). Além disso, a STZ produz metilação, além de reduzir os níveis da nicotina adenina dinucleotídeo (NAD^+) e subsequente depleção dos estoques energéticos de adenosina trifosfato (ATP), sequência de eventos envolvida diretamente na necrose celular (LENZEN, 2008; VAREDA, 2013).

Cerca de duas horas após a injeção de STZ já se observa hiperglicemia devido à diminuição nos níveis de insulina plasmática. Após seis horas, com a destruição das células β -pancreáticas e concomitante liberação do conteúdo de insulina, ocorre hipoglicemia (KING, 2012).

Além disso, após a administração de STZ, ocorre uma destruição irreversível de uma elevada percentagem de ilhotas β -pancreáticas, o que resulta na diminuição da produção e secreção insulina endógena. A indução do diabetes é normalmente realizada 5 a 7 dias antes do início do período experimental a fim de assegurar uma hiperglicemia sustentada (VENKATACHALAM et al., 2016).

Modelo com animais experimentais para induzir o diabetes por STZ tem sido amplamente utilizado em estudos de bioprospecção de produtos naturais que possam exercer ações antidiabéticas ou fornecer novas moléculas para o tratamento do DM e suas comorbidades (SILVA et al., 2015).

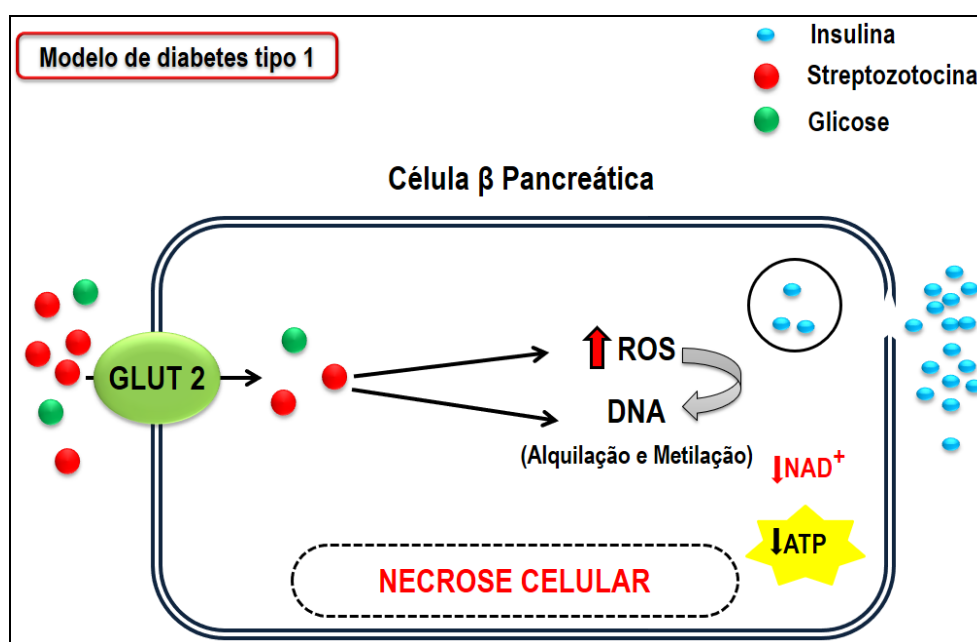


Figura 5. Mecanismo de ação da estreptozotocina

2.3 Hiperglicemia e Dislipidemia Diabética

A hiperglicemia crônica está associada às complicações microvasculares como as retinopatias, nefropatias, neuropatias, ulceração e amputação de membros inferiores e também macrovasculares, sobretudo as doenças cardiovasculares (remodelamento cardíaco) (STRUTHERS & MORRIS, 2002; DEVEREUX, et al., 2007; RAHMAN, et al., 2007; NGUYEN, et al., 2012). A dislipidemia diabética (DD) caracterizada por baixos níveis de colesterol associado às lipoproteínas de alta densidade (HDL-C), elevados índices de triglicérides (TG) e colesterol associado às lipoproteínas de baixa (LDL-c) e baixíssima densidade (VLDL-C) (MATHEUS et al., 2013) em virtude da maior mobilização de ácidos graxos decorrente da ausência e/ou da resistência à insulina (HUSEINI, et al., 2012; KIANBAKHT & DABAGHIAN, 2013). Esta condição está diretamente associada ao aumento da incidência de doenças cerebrovasculares (GRAF, et al., 2010; CHAVALI, et al., 2013), pelo aumento dos níveis plasmáticos de ácidos graxos livres (AGL) e o acúmulo de lipídios nos cardiomiócitos (lipotoxicidade) contribuindo para cardiomiopatia diabética (MAISCH, 2011).

Os triglicerídeos plasmáticos representam um complexo arranjo de gorduras neutras (triacilglicerol), ésteres de colesterol, fosfolipídios e colesterol livre associada a apoproteínas de densidade variável de origem intestinal (quilomícrons) ou hepática (VLDL). De modo que, os níveis séricos de TG representam um balanço entre a secreção e a remoção de TG pelos tecidos competentes, como intestino, fígado e tecido adiposo branco, principalmente (TASKINEN & BORÉN, 2015).

A insulina tem papel chave no controle dos níveis séricos de TG (CZECH et al., 2013; BORÉN et al., 2015). Em humanos é demonstrado que a insulina inibe agudamente a produção de apoproteína B48 (apoB48), assim como a secreção de quilomícrons (XIAO & LEWIS, 2012). Além disso, os níveis de VLDL são determinados pela disponibilidade de lipídios (HIUKKA et al., 2005).

Os TG, de origem intestinal ou hepática, são extraídos das lipoproteínas pela atividade da lipase lipoproteica (LPL), enzima controlada pela insulina, cuja atividade aumenta a disponibilidade de AGL para o tecido adiposo branco e muscular, principalmente (ADIELS et al., 2006), formando os quilomícrons remanescentes. Os níveis plasmáticos de TG associados à apoproteína não dependem somente da síntese ou degradação, mas também da remoção das partículas remanescentes. Em

diabéticos, a captação hepática de VLDL, IDL e LDL também estão reduzidas, elevando os níveis plasmáticos destas frações e do TG (RICHES et al., 1998; WATTS et al., 2003).

Deste modo, a hipertrigliceridemia observada em pacientes com resistência à insulina e/ou DM é o resultado de uma combinação de processos complexos que envolvem a maior captação intestinal de lipídio, aumento na produção de VLDL e diminuição de sua depuração (KAUR, 2014; XIAO et al., 2012; ADA CUEVAS & ALONSO 2016).

2.4 Plantas medicinais e diabetes

Apesar das alternativas de tratamento para o DM que incluem a modificação de hábitos de vida (dieta e exercício físico) e terapia farmacológica com o uso de hipoglicemiantes orais ou insulina exógena, o controle glicêmico é limitado pela baixa adesão dos pacientes aos programas de modificação de estilo de vida ou pelos efeitos colaterais dos fármacos (COHEN & HORTON, 2007; DEROSA & SIBILLA, 2007).

Agentes antidiabéticos orais são substâncias que, quando ingeridas, têm a finalidade de baixar a glicemia e mantê-la normal (jejum < 100 mg/dl e pós-prandial < 140 mg/ dl) OLIVEIRA, 2004. Sob esse conceito amplo, de acordo com o mecanismo de ação principal, os antidiabéticos orais podem ser separados em: aqueles que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilureias e glinidas); os que reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases); os que diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); e/ou os que aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas), DIRETRIZES, SBD, 2016.

Diante disso, é justificado o interesse da comunidade científica em avaliar extratos vegetais brutos e suas frações na busca por novas moléculas que possam ser eficientes no controle glicêmico em longo prazo, e com isso prevenir ou atenuar as comorbidades diabéticas como a dislipidemia diabética, as alterações cardiovasculares e, portanto, o aumento na expectativa e na qualidade de vida destes pacientes.

Estima-se que cerca de três quartos da população mundial utiliza plantas medicinais para sanar necessidades básicas de saúde (NUNES, et al., 2003; LIRA, et al., 2005; LIU & WANG, 2008; PANDEY, et al., 2013), o que ocorre não somente

em áreas rurais de países em desenvolvimento, mas também em países desenvolvidos, onde a medicina oficial é dominante (BALLABH & CHAURASIA, 2007). Além de economicamente mais acessível, o uso de produtos naturais tem uma estreita relação com a cultura local e as espécies vegetais comumente encontradas na região (STANGELAND et al., 2008), muitas das quais não tiveram sua eficácia e segurança toxicológica avaliadas.

Hoje, há mais de 85.000 espécies vegetais com efeito biológico comprovado, incluindo atividade antibacteriana, anticarcinogênica, anticoagulante, antiparasitária, antidiabética e imunossupressora (BALUNAS & KINGHORN, 2005), isto é, 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal (YÖREK et al., 2008). Entretanto, menos de 1% do total da flora conhecida foi avaliada quanto ao seu potencial fitoquímico e farmacológico (PETLEVSKI et al., 2001), e os mecanismos de ação através dos quais os extratos vegetais exercem seus efeitos biológicos ainda são muito pouco conhecidos. A OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Atualmente, o Brasil ocupa a 10^a posição na lista de consumidores mundiais de plantas medicinais (OLIVEIRA, et al. 2012), por diferentes razões, dentre elas a biodiversidade, atividade biológica demonstrada, baixo custo para o paciente e reduzido efeito adverso ou tóxico (LIMA, et al., 2013). Considerando que o Brasil detém uma das maiores biodiversidades do mundo, o amplo uso pela população de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas, como o DM, tem intensificado o interesse da comunidade científica e também de empresarial, para estudar as espécies nativas e seus princípios ativos (SHERIDAN, 2012), o que se torna estratégico para o desenvolvimento econômico do país, a preservação do patrimônio botânico e para a saúde pública.

Neste contexto, estudos etnobotânicos têm identificado plantas candidatas para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes patologias, inclusive do DM e suas complicações, a partir do uso popular por comunidades tradicionais (CANALES et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2007; LIMA et al., 2010). Contudo percebe-se a necessidade do refinamento das estratégias de bioprospecção para redução do custo e o tempo investido entre a

coleta etnobotânica e o ensaio biológico (ARAÚJO et al., 2008). Neste sentido, espécies ricas em compostos fenólicos (polifenóis e flavonóides), moléculas com ações antioxidantes e anti-inflamatórias, têm seus efeitos antidiabéticos confirmados (HANHINEVA et al., 2010; BAHADORAN et al., 2013).

Medicamentos (posologia mínima e máxima em mg)	Mecanismo de ação	Redução da glicemia de jejum (mg/dl)	Contraindicações	Efeitos colaterais	Outros efeitos benéficos
Sulfonilureias					
Clorpropamida (125 a 500) Glibenclamida (2,5 a 20)	Aumento da secreção de insulina	60-70*	Gravidez, insuficiência renal ou hepática	Hipoglicemia e ganho ponderal	
Metiglinidas					
Repaglinida 0,5 a 16 Nateglinida 120 a 360	Aumento da secreção de insulina	20-30*	Gravidez	Hipoglicemia e ganho ponderal discreto	Redução do espessamento médio intimal carotídeo
Biguanidas					
Metformina (1.000 a 2.550)	Reduz a produção hepática de glicose com menor ação sensibilizadora da ação insulínica	60 a 70*	Gravidez, insuficiências renal, hepática, cardíaca, pulmonar e acidose grave	Desconforto abdominal, diarreia	Diminuição de Eventos cardiovasculares Prevenção de DM2 Melhora do perfil lipídico Diminuição do peso
Inibidores da alfa glicosidase					
Acarbose (50 a 300)	Retardo da absorção de carboidratos	20 a 30*	Gravidez	Meteorismo, flatulência e diarreia	Diminuição de eventos cardiovasculares Prevenção de DM2 Melhora do perfil lipídico
Glitazonas					
Pioglitazona (15 a 45)	Aumento da sensibilidade à insulina em músculo, adipócito e Hepatócito (sensibilizadores da insulina)	35 a 65*	Insuficiência cardíaca classes III e IV Insuficiência hepática Gravidez	Retenção hídrica, anemia, ganho ponderal, insuficiência cardíaca e fraturas	Prevenção de DM2 Melhora do perfil lipídico Redução da gordura hepática

Tabela 1. Medicamentos antidiabéticos, adaptado de Adolfo, 2016

* Reduções médias da glicemia de jejum para monoterapia. No caso de terapia combinada, pode ocorrer efeito sinérgico, com potencialização da redução dos níveis glicêmicos.

2.5 *Spondias tuberosa*

Dentre os biomas do Brasil, a Caatinga se destaca como o único inteiramente nacional, com todos os seus limites em território brasileiro. Tradicionalmente, a Caatinga foi considerada por décadas pobre em diversidade biológica, não existindo interesse em se conhecer melhor este Ecossistema, o que o tornou um dos mais

ameaçados do mundo (JAZEN, et al. 1997). Contrariando este entendimento, estudos recentes têm revelado a exuberante biodiversidade da Caatinga, assim como mostrado que as espécies nativas ou exóticas são amplamente utilizadas na medicina popular e na fabricação de fitoterápicos, tais como *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Amburana cearensis* (Arr. Cam.), *Erythrina velutina* Willd., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul, *Bauhinia cheilantha* (Bong) Steud. e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (ALMEIDA & ALBUQUERQUE, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2007)

Associado a isso, sabe-se que espécies que ocorrem neste bioma apresentam uma forte tendência para acumular classes importantes de fitoquímicos, como os compostos fenólico, flavonoides e polifenóis (ALMEIDA et al., 2002; ALBUQUERQUE et al., 2007), com uma ampla variedade de efeitos farmacológicos comprovados, dentre eles os efeitos anti-inflamatórios, antioxidante, hipolipemiante e antidiabético (BABU et al., 2013; BAHADORAN et al., 2013). Espécies do mesmo gênero têm sido utilizadas na medicina popular para tratar doenças sistêmicas, como inflamação de garganta, prostatite, bem como apresentam atividade antiviral, hipoglicemiante e antioxidante. Partes desses efeitos podem ser atribuídos à alguns compostos já caracterizados como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos e triterpenos (CABRAL, et al. 2016).

O gênero *Spondia* é constituído por 18 táxons distribuídos por regiões tropicais do Velho Mundo e Neotropicais (SILVA-JÚNIOR, 2004), incluindo a Caatinga. Dentre as espécies nativas deste bioma, a *Spondia tuberosa* Arruda (Família Anacardiaceae), popularmente conhecida como umbu, umbuzeiro, imbu ou imbuzeiro (LORENZI, 2002) é amplamente utilizada como alimento, assim como é uma espécie sacralizada pela população por representar resistência à adversidade ambiental, sobretudo por florescer em períodos de estiagem, oferecendo alimento aos homens e animais (LINS NETO et al., 2010).



Figura 6. *Spondias tuberosa* Arruda (umbu), disponível em: http://www.tudosobreplantas.com.br/asp/plantas/ficha.asp?id_planta=211

Esta espécie é de grande importância para o Bioma Caatinga, pois além de sobreviver sob as condições hostis do clima semiárido, consegue produzir uma grande quantidade de frutos, os quais são ricos em carboidratos e vitamina C (ácido ascórbico), apresentando ainda, teores significativos das vitaminas A, B1, fibra e sais minerais. Além de desempenhar papel nutricional, uma vez que a comercialização dos frutos do umbuzeiro é a principal fonte de renda para a maioria dos pequenos agricultores durante a época de safra (LIMA FILHO, 2011)

Além disso, também é utilizada com finalidades terapêuticas, inclusive no combate a alterações metabólicas importantes como as dislipidemias, inflamações, distúrbios gastrointestinais, diabetes entre outros (LINS NETO, et al. 2010; DA SILVA SIQUEIRA et al., 2016). Análises fitoquímicas desta espécie têm mostrado altos teores de compostos fenólicos (MELO & ANDRADE, 2010; DA SILVA et al., 2012), assim como intensa atividade antioxidante (GREGORIS et al., 2013), características que a torna uma candidata natural à avaliação dos efeitos antioxidantes e hipoglicemiantes *in vivo* no DM. Deste modo, propomos avaliar o efeito hipoglicemiante e hipolipemiante *in vivo* de *Spondias tuberosa* em ratos normais e diabéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* Arruda (EEBStc) no metabolismo de carboidratos e lipídios em ratos normais e diabéticos.

3.2 Específicos

Avaliar os efeitos *in vivo* do EEBStc nos seguintes parâmetros metabólicos em ratos normoglicêmicos e diabéticos:

- a) Glicemia pós-prandial e de jejum;
- b) Ganho de massa ponderal;
- c) Volume urinário;
- d) Ingestão de água e ração;
- e) Tolerância à glicose;
- f) Conteúdo de glicogênio hepático;
- g) Massa magra (músculos *soleus*, extensor longo dos dedos (EDL), tibial anterior), massa do tecido adiposo (epididimal e retroperitoneal) e fígado.
- h) Perfil bioquímico (colesterol total e frações, triglicérides, transaminases hepáticas, creatinina, proteínas totais, albumina e glicosúria, ureia sérica e urinária);

4 CONCLUSÕES

Nossos dados demonstraram que o tratamento com extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* exerce efeitos antidiabético, hipolipemiante e hepatoprotetor em ratos. Desta forma, estes resultados justificam, pelo menos em parte, o uso popular desta espécie no combate ao DM.

Este trabalho suscita a investigação dos mecanismos moleculares, bem como qual dos fitoquímicos envolvidos no efeito antidiabético da *S. tuberosa*.

REFERÊNCIAS

- ADA-CUEVAS, M. ALONSO R. K. Dislipidemia diabética. **Rev. Med. Clin. Condes**; 27(2) 152-159]. 2016.
- ADIELS, M. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. **Diabetologia**.49: 755–765. 2006.
- ALBERTI, G. et al. Consensus Workshop Group. Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. **Diabetes Care** 27: 1798-1811, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P.et al. Medicinal plants of the caatinga(semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol**. 114: 325-354, 2007.
- ALMEIDA, C.F.C.B.R; ALBUQUERQUE U.P. Uso e conservação ao de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): um estudo de caso. **Interciencia** 26: 276–285, 2002.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northesat Brazil). **J Arid Enviromnm** 62: 127 – 142, 2005.
- ARAÚJO, T. A. S. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge **J Ethnopharmacol**. 120: 72-80, 2008.
- ARTS, I. C. HOLLMAN, P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **Am J Clin Nutr** 81: 317S-325S, 2005.
- BABU, P. V.; LIU, D.; GILBERT, E. R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **J Nutr Biochem**. 24(11):1777-89, 2013.
- BAHADORAN, Z.; MIRIMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **J Diabetes Metab Disord**. 12:1-9, 2013.
- BALLABH, B. CHAURASIA, O.P. “Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh- Used in treatment of cold, cough and fever,” **J Ethnopharmacol**. 112: 341–345, 2007.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. 78: 431–441, 2005.

BAVILONI, P. D. et al. Mechanism of anti-hyperglycemic action of *Vaitarea Macrocarpa* (Leguminosae): investigation in periphereal tissues. **J ethnopharmacol.** **131**(1):135-139, 2010.

BIBBÓ, et al. Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis?. **Ann Med.** **Aug 8:1-25.** 2016.

CABRAL, et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** **26** 304–311. 2016.

CANALES, M. et al. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. **J Ethnopharmacol.** **97:** 429-439, 2005.

CHAVALI, V. TYAGI, S. C. MISHRA, P. K. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Metab Syndr Obes.** **11:** 151-160, 2013.

CHEN, P. et al. Factors and Management of Gestational Diabetes Penglong. **Cell Biochem Biophys.** 2014.

COHEN, A.; HORTON, E.; S. Progress in the treatment of type 2 diabetes: new pharmacologic approaches to improve glycemic control. **Curr Med Res Opin.** **23:** 905-917, 2007.

COLBERG, S. R. CASTORINO, K. JOVANOVIC, L. Prescribing physical activity to prevent and manage gestational diabetes. **World J Diabetes.** **4**(6): 256-62. 2013.

CZECH. M. P. et al. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. **Diabetologia.** **56:**949–964. 2013.

DA SILVA, A. R. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology.** **50**(6): 740-746. 2012.

DA SILVA SIQUEIRA, E. M. et al. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. **Biomed Chromatogr.** Apr 8. 2016.

DEROSA, G. SIBILLA S. Optimizing combination treatment in the management of type 2 diabetes. **Vasc Health Risk Manag.** **3:** 665-671, 2007.

DESHPANDE, A. D. et al. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. **Phys Ther.** **88**(11): 1254-1264, 2008.

DEVEREUX, R. B. DAHLÖF, B. Potential mechanisms of stroke benefit favoring losartan in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension (LIFE) study. **Curr Med Res Opin.** **23**: 443-57, 2007.

ADOLFO, MILECH. et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: **A.C. Farmacêutica**, 2016.

GARCÍA-DÍAZ, J. B. et al. Antidiabetic, antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects of tilianin in streptozotocin-nicotinamide diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** 83;667–675. 2016.

GOLBERT, A. CAMPOS M. A. Diabetes Melito Tipo 1 e Gestação. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 52-2. 2008

GRAF, B. L. et al. Plant-derived therapeutics for the treatment of metabolic syndrome. **Curr Opin Investig Drugs.** **11**: 1107–1115, 2010.

GREGORIS, E et al. Antioxidant Properties of Brazilian Tropical Fruits by Correlation between Different Assays. **Biomed Res Int.** 132759. 2013.

HANHINEVA K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **Int J Mol Sci.** **11**: 1365-1402, 2010.

HIUKKA, A. et al. Alterations of lipids and apolipoprotein CIII in VLDL subspecies in type 2 diabetes. **Diabetologia** 48:1207– 1215. 2005.

HUSEINI H. F. et al. Anti-hyperglycemic and anti-hypercholesterolemic effects of Aloe vera leaf gel in hyperlipidemic type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Planta Med.** **78**: 311-316, 2012.

IFD Diabetes atlas www.idf.org. Bruxelas, 2015.

JANZEN, D. H. Florestas tropicais secas. In: WILSON EO (Org), Biodiversidade, São Paulo: Editora Nova Fronteira, p. 166-176, 1997.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiology Research and Practice.** 2014.

KAWASHITA, N. H. BAVIEIRA, A. M. Evaluation of Medicinal Plants Used to Diabetes Treatment. In: J.N. Govil; V.K. Singh (Org.). Recent Progress in Medicinal Plants - "Drug Plants III". **Houston: Studium Press LLC.** v. **29**, p. 115-159, 2010.

KIANBAKHT S.; DABAGHIAN F. H. Improved glycemic control and lipid profile in hyperlipidemic type 2 diabetic patients consuming *Salvia officinalis* L. leaf extract: A randomized placebo. Controlled clinical trial. **Complement Ther Med.**21: 441-446, 2013.

KING, A.F.J. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology.**166877–894. 2012.

KIRSTEN, V.R. SESTERHEIM, P. SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirão Preto)**;43(1):3-10. 2010.

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

LIMA L. C. et al. Perfil Sócio-Econômico-Cultural dos Comerciantes de Plantas Medicinais de Campina Grande, Paraíba. **Pharmacia Brasileira** 77: 38-41, 2010.

LIMA C. M. et al. Bioassay-guided evaluation of *Dioscorea villosa* – an acute and subchronic toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory approach. **BMC Complement Altern Med.** 2013.

LIMA FILHO, J.M.P. Ecofisiologia do umbuzeiro (*Spondias tuberosa*, Arr. Cam.). Pinheiro Lima Filho. Petrolina: **Embrapa Semiárido**, 2011.

LINS NETO, E. M. F.; PERONI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Traditional knowledge and management of *Spondias tuberosa* Arruda (Umbu), Anacardiaceae, an endemic species from the semi-arid region of northeast Brazil. **Economic Botany**, 64 (1), pp. 11–21, 2010.

LIRA E. C.; SANTOS V. L.; SILVA J. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato bruto da raiz da *Cassia occidentalis* L. (Mangerioba). **Rev Bras Farm.** 86: 53-56, 2005.

LIU, Y. WANG, M. W. Botanical drugs: challenges and opportunities: contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sci.** 82: 445-449, 2008.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Ed. Plantarum.** p. 352. 2002.

MAISCH B, ALTER P, PANKUWEIT S. Diabetic cardiomyopathy – fact or fiction? *Herz*;36(2):102–115. 2011.

MATHEUS A.S Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. **International Journal of Hypertension**. 53789, 15 pages. 2013

MELO, E. M. & ANDRADE, R. A. M. S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. **Alim Nutr**. **21**(3):453-457, 2010.

Ministério da saúde (www.portalsaude.saude.gov.br.), acessado em 21/08/2016

NGUYEN, D. V. SHAW, L. C. GRANT, M. B. Inflammation in the pathogenesis of microvascular complications in diabetes. **Front Endocrinol (Lausanne)**. **3**: 1-7, 2012.

NUNES G. P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Farmacogn**. **13**: 83-92, 2003.

OLIVEIRA, H. C. Antidiabetic activity of Vatairea macrocarpa extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 115, 515–519. 2008.

OLIVEIRA, J.E.P, MILECH A, editors. Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar. São Paulo: Atheneu; 2004.

OLIVEIRA S. G. et al. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **J Ethnopharmacol**. **140**: 428-37, 2012.

PANDEY, M. M.; RASTOGI, S.; RAWAT, A. K. Indian traditional ayurvedic system of medicine and nutritional supplementation. **Evid Based Complement Alternat Med**.376327, 2013.

PANIGRAHI, G. PANDA, C. PATRA, A. Extract of Sesbania grandiflora Ameliorates Hyperglycemia in High Fat Diet-Streptozotocin Induced Experimental Diabetes Mellitus. **Scientifica**. 4083568.P10. 2016.

PETLEVSKI, R. et al. Effect of 'antidiabetis' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. **J Ethnopharmacol**75:181-4, 2001.

RAHMAN, S. et al. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. Diabetes **Obes Metab**. **9**: 767–780, 2007.

RICHES, F. M. et al. Hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 studied with a stable isotope technique in men with visceral obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*;22:414–23. 1998.

SANTANGELO, C. et al. Could gestational diabetes mellitus be managed through dietary bioactive compounds? Current knowledge and future perspectives. **Br J Nutr.** Apr 14;115(7):1129-44. 2016.

SANTOS, A. M. C et al. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. **Medicina (Ribeirão Preto)**;45(4): 436-44. 2012.

SHERIDAN, C. Recasting natural product research. **Nature Biotechnol.** 7;30(5):385-7. 2012.

SILVA, A.C.M. Acute and subchronic antihyperglycemic actives of *Bowdichia virgilioides* roots in non-diabetic and diabetic rats. **J Intercult Ethnopharmacol.** v.4,1. 2015.

SILVA, A.L. et al. Neonatal outcomes according to different therapies for gestational diabetes mellitus. **J Pediatr.** 2016.

SILVA-JÚNIOR, J. F. et al. Collecting, ex situ conservation and characterization of “cajáumbu” (*Spondias mombin* x *Spondias tuberosa*) germplasm in Pernambuco State, Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution.** 51: 343-349, 2004.

SOCARRÁS, T.J.O. Influência do diabetes tipo 1 no reparo de lesões produzidas por implantes intraperitoneais e subcutâneos em ratos wistar. Universidade Federal de Minas Gerais Programa de Pós-Graduação em Patologia Belo Horizonte-MG. 2014.

SOMANI, R. KASTURE, S. SINGHAI, A.K. Antidiabetic potential of *Butea monosperma* in rats. **Fitoterapia.** 77: 86-90. 2006.

SONAGRA, A. D. et al. Normal pregnancy – a state of insulin resistance. **J Clin Diagn Res** 8, CC01–CC03. 2014.

STANGELAND T, DHILLION SS, REKSTEN H. Recognition and development of traditional medicine in Tanzania. **J Ethnopharmacol.** 117:2 290-299, 2008.

STRUTHERS A. D.; MORRIS A. D. Screening for and treating left-ventricular abnormalities in diabetes mellitus: a new way of reducing cardiac deaths. **Lancet.** 359: 1430-1432, 2002 .

SU, H.C.; HUNG, L.M.; CHEN, J.K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metabol.** 290(6): E1339-1346, 2006.

TASKINEN, M. R., BOREN J. New insights into the pathophysiology of dyslipidaemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 239: 483-95. 2015.

VAREDA, P. M. P. A avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Myrcia bela* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista , Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

VENKATACHALAM, P. et al. Antidiabetic potential of bioactive molecules coated chitosan nanoparticles in experimental rats. **International Journal of Biological Macromolecules**. S0141-8130(16)30711-5. 2016.

VINER R. M. et al. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. **Arch Dis Child**. 90:10-14, 2005.

WATTS, G. F. et al. Differential regulation of lipoprotein kinetics by atorvastatin and fenofibrate in subjects with the metabolic syndrome. **Diabetes**;52:803–11. 2003

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**.;57/5. 2013

XIAO, C.; & LEWIS, G. F. Regulation of chylomicron production in humans, **Biochim. Biophys. Acta** 1821.736e746. 2012.

XU, ZHAOHUI. et al. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from Fructus Arctii in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2014.

YÖREK, N. et al. An Investigation on Students' perceptions of biodiversity. **Natura Montenegrina** 7: 165–173, 2008.

YUEN, L. & WONG, V. W. Gestational diabetes mellitus: Challenges for different ethnic groups. **World J. Diabetes**. Jul.25;6(8): 122432.2015.

ANEXO A - Efeito anti-diabético e anti-hiperlipidêmico do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* arruda em ratos

Efeito anti-diabético e anti-hiperlipidêmico do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* Arruda em ratos

Humberto de Moura Barbosa¹, Ivanildo Inácio da Silva Junior¹, Jailson Nunes do Nascimento¹, Thiago Antônio de Souza Araújo³, Ulysses Paulino Albuquerque³, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira², Dayane Aparecida Gomes¹, e Eduardo Carvalho Lira^{1*}

^{1*} Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

² Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

³ Laboratório de Etnobotânica Aplicada, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, PE, Brasil

Resumo

Spondia tuberosa Arruda, Anacardiaceae, popularmente conhecida como umbu, é uma espécie nativa da Caatinga, endêmica do semiárido brasileiro utilizada na medicina popular, no tratamento de diferentes patologias, dentre elas diabetes. A atividade do extrato etanólico bruto da casca de *S. tuberosa* (EEBStc) foi avaliada em ratos diabéticos induzido por estreptozotocina (STZ). O extrato foi administrado por via oral na dose de 250mg/kg e 500mg/kg durante 21 dias, em animais normais e diabéticos. O tratamento EEBStc reduziu a glicemia de jejum e pós-prandial, assim como a poliúria, polidipsia, polifagia, a perda ponderal, a diurese, a excreção urinária de glicose e ureia, bem como redução de processos catabólicos (proteólise e lipólises) em ratos diabéticos. Além disso, atenuou a hipertrigliceridemia e os elevados índices séricos de VLDL. O EEBStc (500mg/Kg) melhorou a tolerância oral à glicose em ratos diabéticos. Assim, nossos resultados sugerem que o tratamento com extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* tem ações antidiabética, hipolipemiante e hepatoprotetora em ratos, o que, além de confirmar o uso popular desta espécie, demonstra seu uso como tratamento coadjuvante do diabetes *mellitus* e suas comorbidades.

Palavras-chave: Diabetes, Estreptozotocina, Hipoglicemiante, Hipolipemiante, Hepatoprotetor, *Spondia tuberosa*.

Autor correspondente:

Dr. Eduardo Carvalho Lira

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas,

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-901, Brasil.

Fone: 55 (81) 2126-8530

Fax: 55 (81) 2126-8976

Endereço de e-mail: eduardoclira@gmail.com

Abstract

Spondias tuberosa Arruda, popularly known as umbu, is native from savanna-like vegetation and widely used for medicinal purposes, including diabetes. The aim of this study was evaluated the antidiabetic and hypolipemiant effect of ethanolic extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark (EESTb) in rats. Normal and streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats were treated orally with 250 or 500 mg/kg body weight of EESTb for 21 days. EESTb (500 mg/kg/day) promoted reduction fasting and post prandial glycaemia, urinary urea and glucose, polyphagia, polyuria, polydipsia, as well as reduced catabolic processes (lipolysis and proteolysis) in diabetic rats. In addition, EESTb improved oral glucose tolerance and decreased triglycerides and VLDL serum levels when compared to the diabetic control rats. Furthermore, EESTb reduced hepatic transaminases levels in diabetic rats. Through the anti-diabetic, hypolipemiant and hepatoprotective effects of the EESTb, this specie represents a possible dietary adjunct for the treatment of diabetes.

Key-words: Diabetes, Streptozotocin, hypoglycemic, hypolipidemic, hepatoprotective, *Spondias tuberosa*

Introdução

O diabetes *mellitus* (DM) é definido pela hiperglicemia persistente associada a alterações no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas decorrentes da ausência e/ou resistência periférica à insulina (WHO, 2015; Domínguez-Mendoza et al., 2016). É uma endocrinopatia de alta prevalência que representa um dos maiores desafios à medicina no século 21 com grande impacto social e econômico traduzido em custos da ordem de 612 bilhões de dólares/ano para a prevenção e o tratamento do DM e suas comorbidades (Somani, 2006; IFD, 2015).

A hiperglicemia crônica está diretamente associada às micro (retinopatia, nefropatia, neuropatias) e macroangiopatias (doenças cardiovasculares) (Patel et al., 2012). Atualmente, a farmacoterapia utilizada no tratamento do DM envolve o uso de insulina exógena e

hipoglicemiante oral, tais como as sulfonilureias e biguanidas, o que tem sido limitado pelos efeitos adversos, dentre outros, a hipoglicemia, ganho ponderal e disfunções hepáticas (Patel et al., 2012; Widyawati et al., 2015). Diante disso, buscaram-se novas alternativas terapêuticas para o tratamento do DM e suas comorbidades. Estima-se que cerca de três quartos da população mundial utiliza plantas medicinais para sanar necessidades básicas de saúde (Lira et al., 2005; Pandey et al., 2013). Mais de 400 plantas tem seu potencial antihiperglicemiante reconhecido (Ernst, 1997), as quais são utilizadas como estratégia para o controle glicêmico em longo prazo sem efeitos colaterais significativos (Yankuzo et al., 2011).

Dentre as espécies nativas da Caatinga, único bioma genuinamente brasileiro, está a *Spondia tuberosa* Arruda (Família Anacardiaceae), popularmente conhecida como umbu ou imbu (Albuquerque et al., 2007; Lins Neto et al., 2013). É uma espécie utilizada na medicina popular, no tratamento de diferentes patologias, dentre elas doenças infecciosas, venéreas, antivirais, antibacteriana, distúrbios gastrintestinais e diabetes (Alencar et al., 2015; Da Silva Siqueira et al., 2016). Análises fitoquímicas desta espécie têm mostrado altos teores de compostos fenólicos (Melo & Andrade, 2010), atividade antioxidante (Gregoris et al., 2013), e sem toxicidade aguda aparente (Barbosa et al., 2016), características que a torna uma candidata natural à avaliação do efeito antidiabético em ratos. Deste modo, propomos avaliar o efeito hipoglicemiante e hipolipemiante do extrato etanólico bruto da casca da *S. tuberosa* em ratos diabéticos.

Material e métodos

Preparação do extrato

Cascas de 3 árvores diferentes de *S. tuberosa* foram coletadas em fevereiro de 2013 na cidade de Altinho, Estado de Pernambuco, Brasil. As plantas foram identificadas por botânico especializado em taxonomia e a exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal

Rural de Pernambuco (UFRPE) sob número 48652. O extrato etanólico bruto da casca de *S. tuberosa* (EEBStc) foi preparado por maceração das cascas secas (714g) para obtenção do pó que foi embebido em etanol a 90% e mantido em temperatura ambiente (28°C) durante a noite. O solvente foi removido por evaporação rotativa. O rendimento do EEBStc foi de 15,6% (m/m), em termos de material vegetal recém-colhido. Após a preparação, o extrato seco e evaporado foi armazenado em temperatura ambiente.

Animais

Foram utilizados ratos machos jovens da linhagem Wistar (180±10g) provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, em ambiente controlado com ciclos claro-escuro de 12 horas (ciclo claro: 06h00 às 18h00) e temperatura (23°C ± 2), alimentados com dieta balanceada para ratos (LABINA 5002, 23% de proteínas; 4% de gorduras; 50% carboidratos e 23% e outros componentes) e oferecida água *ad libitum*. Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil (protocolo número 23076.016693/2014-88).

Indução do diabetes

Os animais foram previamente submetidos ao jejum por 12h, em seguida anestesiados com cetamina (80mg/kg) e xilasina (14mg/kg) na proporção de (0,1mL/100g). O DM experimental foi induzido por injeção intravascular pela jugular 40mg/kg de estreptozotocina (STZ, Sigma Aldrich, EUA), dissolvida em tampão citrato (pH 4,5). Cinco dias após a indução do diabetes, os animais com valores de glicemia pós-prandial igual ou superior a 250mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais controles foram submetidos à injeção intravascular de tampão citrato. (Oliveira *et al*, 2008).

Experimento subcrônico

Após a confirmação do diabetes os animais foram distribuídos em 7 grupos com 5 ratos para cada grupo respectivamente, totalizando 35 animais, sendo eles: Grupo controle (C); Grupo controle tratado com 250mg/kg do EEBStc (CT-250mg/kg); Grupo controle tratado com 500mg/kg do EEBStc (CT-500mg/kg); Grupo diabético (D); Grupo diabético tratado com 250mg/kg EEBStc (DT-250mg/kg); Grupo diabético tratado com 500mg/kg do EEBStc (DT-500mg/kg); Grupo diabético tratado com Insulina (DI). Os animais receberam o extrato (tratado) ou água (controle) por via oral (V.O.), uma vez por dia, durante 21 dias. O grupo diabético DI recebeu 3U/rato de insulina NPH - Lilly (s.c.) (Oliveira *et al*, 2008), sendo 1.5U/rato às 08h00 e 1.5U/rato às 17h00, a partir do dia 0 ao dia 21. A massa corporal, volume urinário, ingestão hídrica e alimentar foram analisados diariamente a partir do dia 0 até o dia 21 (fig. 1).

Análise bioquímica

A cada 5 dias a partir do início do tratamento, a glicemia pós-prandial, glicosúria e ureia urinária foram mensuradas. Ao término do tratamento, amostras de soro foram obtidas para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: glicemia pós-prandial e de jejum, proteínas totais, albumina, ureia sérica, transaminase oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP), triglicerídeos, colesterol total e associado à lipoproteína de alta densidade (HDL) através de kits comerciais (Labtest[®], Lagoa Santa, MG). Os níveis do colesterol associado à lipoproteína de baixíssima densidade (VLDL) foi calculado a partir da fórmula de Friedwald ($VLDL = TG/5$). Os níveis de globulina foram determinados a partir da diferença entre albumina e proteínas totais. A glicosúria foi determinada pelo método da ortotoluidina (Dubowski, 1962). Glicogênio hepático e muscular foram determinados pelo método descrito por Carrol et al. 1955.

Massa de tecidos

A massa dos tecidos adiposos retroperitoneal (RETRO) e epididimal (EPI), músculos esqueléticos *soleus* e extensor longo dos dedos (EDL) foram determinados e expressos em mg/mm, normalizado pelo comprimento da tíbia. Para tanto, ratos wistar foram eutanasiados por exsanguinação através de punção na aorta abdominal sob anestesia.

Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

O TOTG foi realizado após o período de tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 12 horas e foram alocados nos grupos: controle (C), diabético (D) e diabético tratado com o EEBStc (DT-500), após o período de 21 dias de tratamento. Todos os animais receberam uma solução de 2,5 g de glicose/kg (V.O). A glicemia foi medida por punção da cauda, utilizando glicosímetro on call[®] plus, seguido do tempo (t = 0) e 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 e 150 min após a administração de glicose.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GRAPH PAD Prism, versão 6.0. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. A análise de variância (ANOVA TWO WAY) foi empregada para analisar os dados entre os grupos tratados e os seus respectivos grupos controle (diabéticos e não diabéticos) seguido de *post test* Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados

Determinação da glicemia pós-prandial e de jejum

Como observado na figura 3, a estreptozotocina induziu um modelo de DM severo com níveis elevados de glicemia pós-prandial ($481,5 \pm 38,1 \text{ mg/dL}$ vs $111,0 \pm 8,3 \text{ mg/dL}$ do controle) e de jejum ($408,4 \pm 6$ vs $115,0 \pm 8,3 \text{ mg/dL}$ do controle). Além disso, os animais diabéticos apresentaram os sinais clássicos da hiperglicemia mantida: poliúria, polidipsia e

polifagia (fig. 2). Ainda que os animais diabéticos não tenha perdido peso, exibiram ganho ponderal reduzido em relação aos animais normoglicêmicos (fig.2).

Como visto na figura 2A, após 21 dias de tratamento com o EEBStc houve uma redução na glicemia pós-prandial (~46%) e de jejum (43%) em animais diabéticos tratados com a maior dose. Além disso, estes animais aumentaram o ganho ponderal (~5X), reduziram polifagia (23%), polidipsia (45%) e poliúria (55%). Neste mesmo sentido, a glicosúria e o aumento da ureia urinária observada em animais diabético foi atenuada pelo tratamento com EEBStc em (~85%) e (~62%), nesta mesma ordem (fig. 2F,G).

Como demonstrado na tabela 2, o EEBStc preservou a massa de músculos tibial anterior (30%) e EDL (~40%), predominantemente glicolíticos, assim como dos tecidos adiposos branco epididimal (2,5X) e retroperitoneal (70%), sem alteração de massa nos demais órgãos avaliados. O DM induziu uma depleção do glicogênio hepático (~60%), o que foi atenuado pelo tratamento com EEBStc (~55%) no grupo tratado com a maior dose (tab. 1), sem alterações no glicogênio muscular. O tratamento com 250mg/Kg de EEBStc não mostrou efeito nos parâmetros metabólicos avaliados. Como esperado, o tratamento dos animais diabéticos com insulina diária foi eficiente no controle do DM.

Na avaliação da tolerância oral à glicose (fig. 3C), o grupo diabético tratado com o EEBStc mostrou um menor pico glicêmico (15%) após a sobrecarga de glicose, além deste ter ocorrido tardiamente (DT500 30min vs DC 15 min) em relação ao grupo diabético. A partir dos 90 minutos, os níveis glicêmicos dos animais tratados foram reduzidos em relação ao grupo diabéticos aos tempos iniciais de sobrecarga. Corroborando este perfil, o cálculo da área sobre a curva (AC) mostrou uma melhor tolerância oral à glicose nos animais tratados com o EEBStc (fig. 3D)

Determinação do perfil lipídico

Neste modelo não houve com elevação dos níveis de colesterol total associada à redução do HDL (fig.4A, B), entretanto, foi observado a hipertrigliceridemia e elevação dos níveis de VLDL em animais diabéticos, os quais foram atenuados pelo tratamento com o EEBStc na maior e menor dose em 86% e 87%, respectivamente (fig.4C, D).

Uma das comordidades diabéticas é o comprometimento das funções hepáticas. Neste sentido, o DM elevou nos níveis séricos das transaminases glutâmico oxalacética e pirúvica, o que foi atenuado pelo EEBStc em, aproximadamente, 30% e 40%, respectivamente. Não foi detectada diferenças na síntese hepática de albumina, proteínas totais e globulina plasmática (tab.1).

Discussão

O tratamento subcrônico com o EEB da casca da *S. tuberosa* reduziu a hiperglicemia, assim como a poliúria, polidipsia, polifagia, a perda ponderal, a diurese, a excreção urinária de glicose e ureia, além de ter um efeito hepatoprotetor em animais diabéticos. Neste mesmo sentido, o EEBStc atenuou a hipertrigliceridemia e os elevados índices de VLDL, mostrando um efeito positivo no perfil lipídico do grupo diabético.

A estreptozotocina (STZ), uma nitrosouréia alquilante de DNA, é um agente diabetogênico amplamente utilizado em modelos animais capaz de promover uma hiperglicemia severa decorrente da necrose das células β -pancreática estabelecendo um diabetes tipo 1 severo (Lenzen, 2008; Venkatachalam et al.,2016). A hiperglicemia determinada pela deficiência e/ou resistência à insulina está, diretamente, associada às comorbidades diabética e ao aumento da mortalidade dos pacientes (Shen et al., 2008; Oladayo, 2016). O EEBStc reduziu a hiperglicemia de jejum e pós-prandial em animais diabéticos (Figs. 3A e 3B). A redução na hiperglicemia pós-prandial pode está associada à

menor produção hepática de glicose, isto é, menor atividade neoglicogênica, acompanhada, ou não, da menor glicogenólise e maior glicogeniogênese, o que pode ser considerado pela preservação dos estoques de glicogênio hepático nos animais do grupo DT-500. É bem compreendido o efeito anabólico e anti-catabólica da insulina no metabolismo do glicogênio, sobretudo por estimular a ação da glicogênio sintase e inibir a glicogênio fosforilase, enzimas envolvidas na síntese e degradação deste carboidratos, respectivamente (Ibrahim et al., 2016).

O EEBStc reduziu a polifagia do grupo diabético, assim como preservou a massa do tecido adiposo e muscular esquelético, o que explica o melhor ganho ponderal no grupo DT-500. A insulina é um hormônio essencialmente anabólico para o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A deficiência e/ou a resistência à insulina está diretamente relacionada a eventos catabólicos como a lipólise e a proteólise muscular (Shen et al., 2008). Em conjunto, a redução da proteólise muscular e menor uremia podem explicar o melhor ganho ponderal dos animais DT-500. Esses efeitos do EEBStc são semelhantes aos encontrados no grupo diabético tratado com insulina, o que sugere que a *S. tuberosa* reduza a hiperglicemia potencializando a secreção e/ou a ação insulínica. Estudos prévios têm demonstrado efeito insulinoatrópicos semelhantes aos encontrados neste estudo em outras espécies do gênero *Spondias* (Iweala et al., 2011; Attanayake et al., 2014).

A redução no volume urinário (diurese osmótica) e a ingestão hídrica (polidipsia) estão intimamente relacionadas à redução dos níveis glicêmicos, sobretudo pelos mecanismos de reabsorção renal de glicose. Um provável mecanismo renal para redução da glicemia é a redução da reabsorção de glicose pelo transportador acoplado sódio-glicose isoforma 2 (SGLT2) presente no túbulo proximal do néfron (Abdul-Ghani et al., 2011). Entretanto esta possibilidade foi excluída a partir da redução da glicosúria observada no grupo DT-500, o que possivelmente foi decorrente da redução da hiperglicemia por alterações de sensibilidade à insulina periférica.

O efeito do EEBStc na tolerância oral a glicose e utilização periférica deste carboidrato permite a criação de algumas hipóteses. A análise da área sob a curva mostrou que o EEBStc melhorou a tolerância oral à glicose em ratos diabéticos (Fig. 3C, e D), o que pode ter ocorrido por uma melhor utilização periférica dos tecidos em decorrência de uma maior secreção ou sensibilidade à insulina; redução na captação intestinal de glicose ou redução de gliconeogênese. Em conjunto, os nossos dados sugerem uma ação insulino-mimética do EEBStc. Trabalhos recentes tem mostrado ação de extratos vegetais como inibidores da atividade de enzimas envolvidas na digestão de carboidratos complexos, como a alfa-glicosidase, ou a atividade dos transportadores SGLT2 o que limita a captação intestinal de glicose (Yusoff et al., 2015; Kaur et al., 2016), o que pode explicar, pelo menos em partes, os resultados aqui relatados.

A elevação dos níveis séricos das transaminases é compatível com necrose hepática, assim como o acúmulo de ureia sérica com a lesão renal (Ibrahim et al., 2016). No estado diabético, a elevação da gliconeogênese e cetogênese está diretamente relacionada ao aumento das alanina e aspartato aminotransferases (Ghosh and Suryawansi, 2001). Neste trabalho, o EEBStc exerceu um efeito hepato e renoprotetor importante em animais tratados com a maior dose.

A dislipidemia diabética (DD), caracterizada pelos altos níveis de TG e redução dos níveis séricos de HDL, representa um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sobretudo por induzir uma dislipidemia com perfil aterogênico (Adeneye et al., 2012; Hemmati et al., 2015; Rosenblit, 2016). Os animais diabéticos apresentaram elevações nos níveis de TG e VLDL, sem modificações nos níveis de HDL. O EEBStc reduziu de forma dose dependente os níveis de TG, assim como os níveis de VLDL, sendo esta redução mais eficaz na maior dose estudada (fig. 4C e D). Ainda que a hiperglicemia tenha correlação direta com a DD, não a explica inteiramente, de modo que a

ausência e/ou a resistência à insulina assume um papel essencial na produção excessiva de TG associada principalmente às frações mais densas da VLDL (Taskinen and Boren, 2015). A DD produz a hipertrigliceridemia por estimular a maior produção hepática associada a uma menor extração de TG circulantes (Szalata et al., 2016), processos diretamente regulados pela insulina. Foi observado um efeito muito semelhante do EEBStc e o tratamento com insulina de animais diabético (fig. 4C), o que nos permite sugerir que a *S. tuberosa* melhora o perfil lipídico provavelmente por melhorar a produção e/ou resistência à insulina. Para confirmar esta hipótese será necessário dosar os níveis plasmáticos deste hormônio.

Conclusão

Nossos resultados sugerem que o tratamento com extrato etanólico bruto da casca de *Spondias tuberosa* tem ações antidiabéticas, hipolipemiante e hepatoprotetor em ratos. Desta forma, estes dados confirmam a indicação popular do umbu como alternativa terapêutica para o DM e suas comorbidades.

Figuras

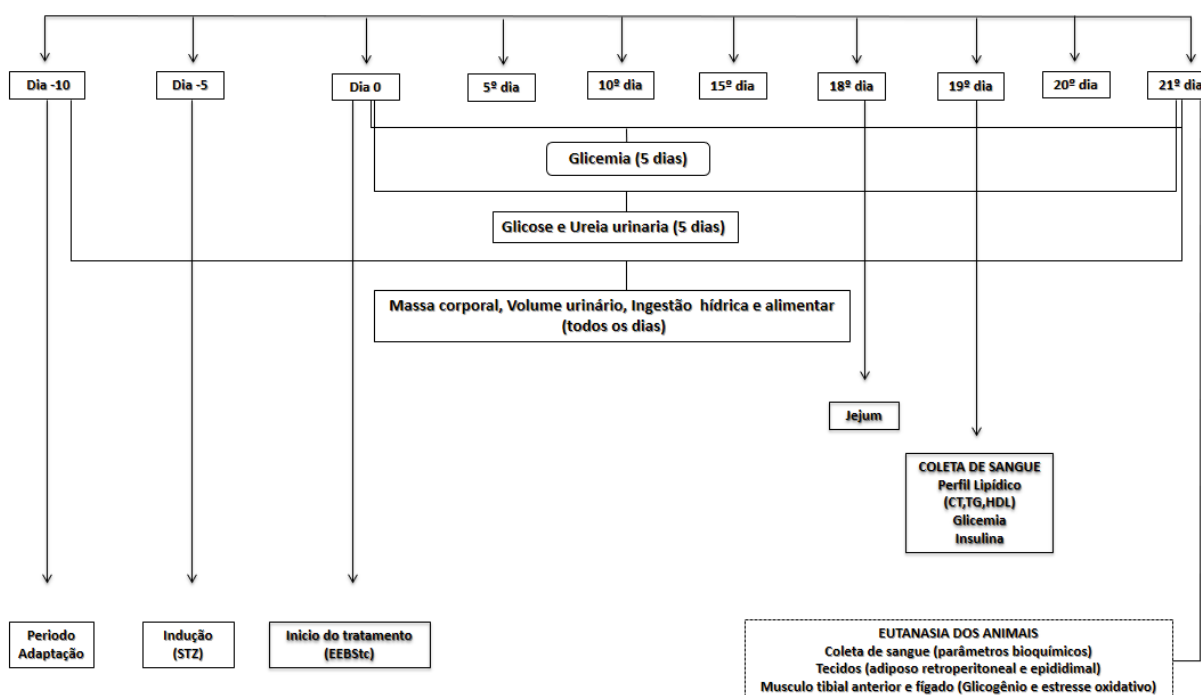


Figura 1. Desenho experimental

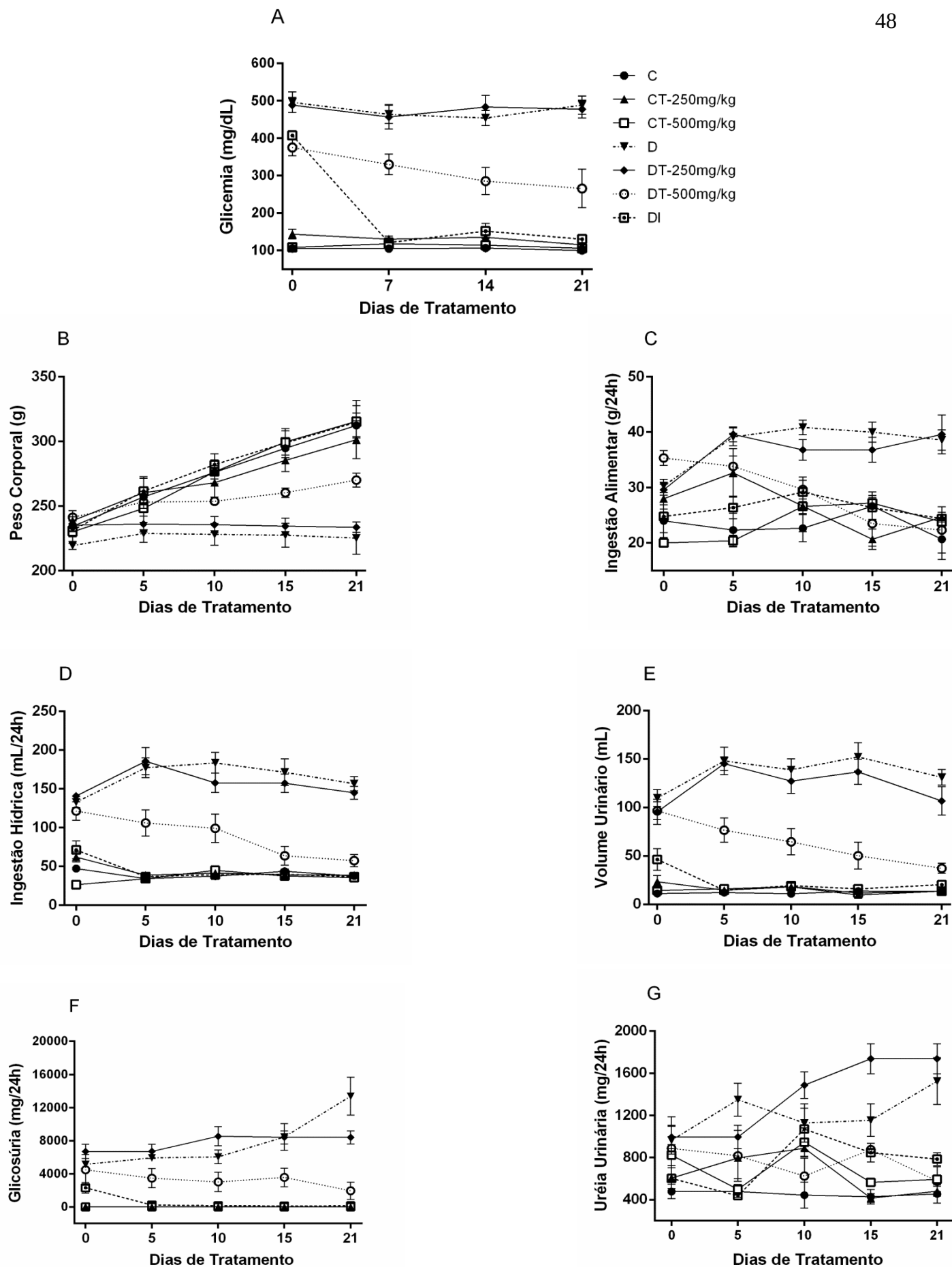


Figura 2. Efeito do extrato da *Spondias tuberosa* sobre a glicemia (A), peso corporal (B), ingestão alimentar (C), ingestão hídrica (D), volume urinário (E), glicosúria (F) e uréia urinária (G). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão em cada ponto da figura, com $n=5$ animais por grupo. Valor de ($p < 0.05$)

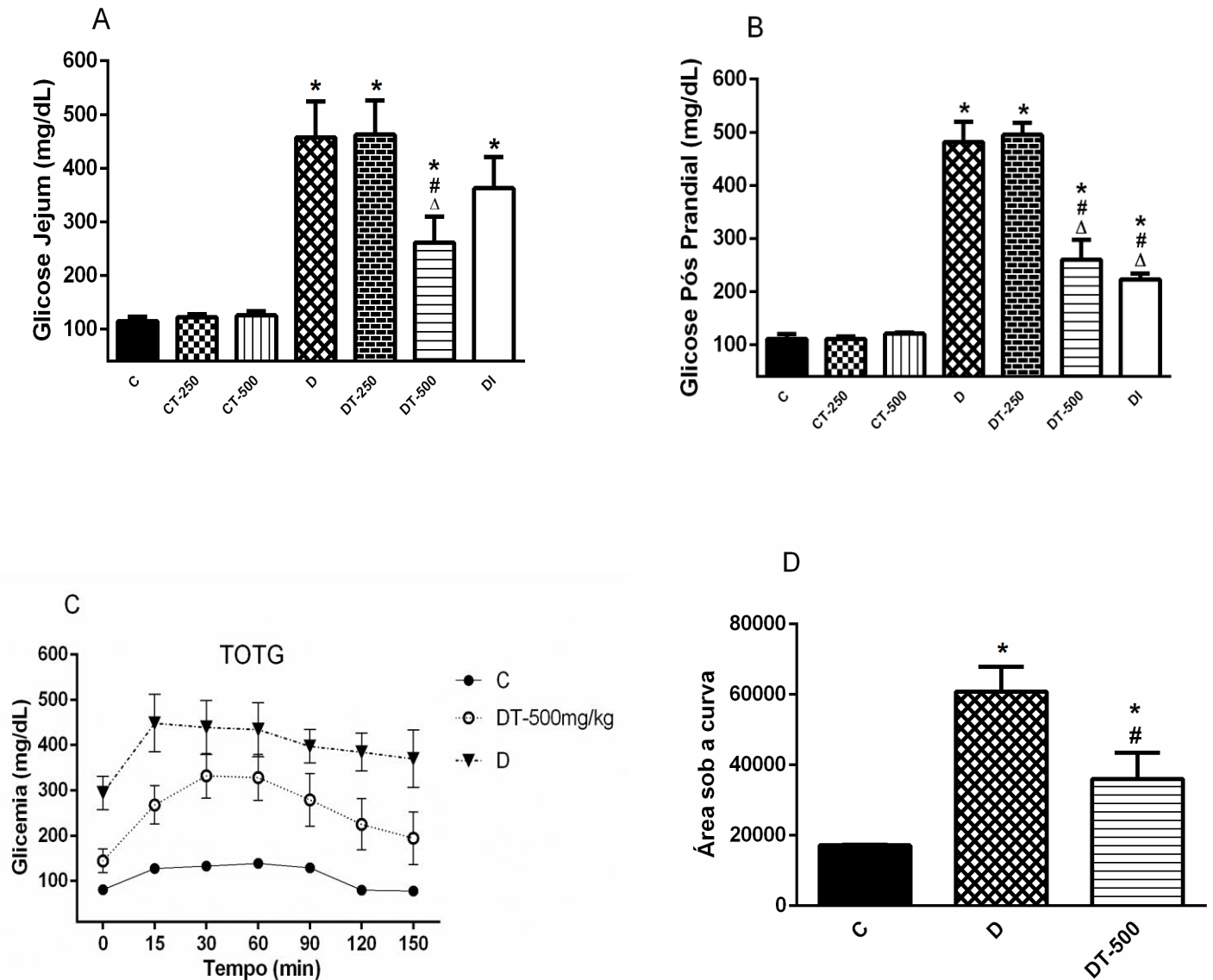


Figura 3. Efeito do extrato da *Spondias tuberosa* sobre a glicose de jejum (A), glicose pós-prandial (B), TOTG (C), área sob a curva (D). Dados são expressos como média $\pm$ E.P; número de animais por grupo: 5. Valor de ($p < 0.05$) diferenças significativas quando comparados (*): controle. (#): diabético tratado 250mg/kg. (Δ): diabético e diabético tratado 500mg/kg.

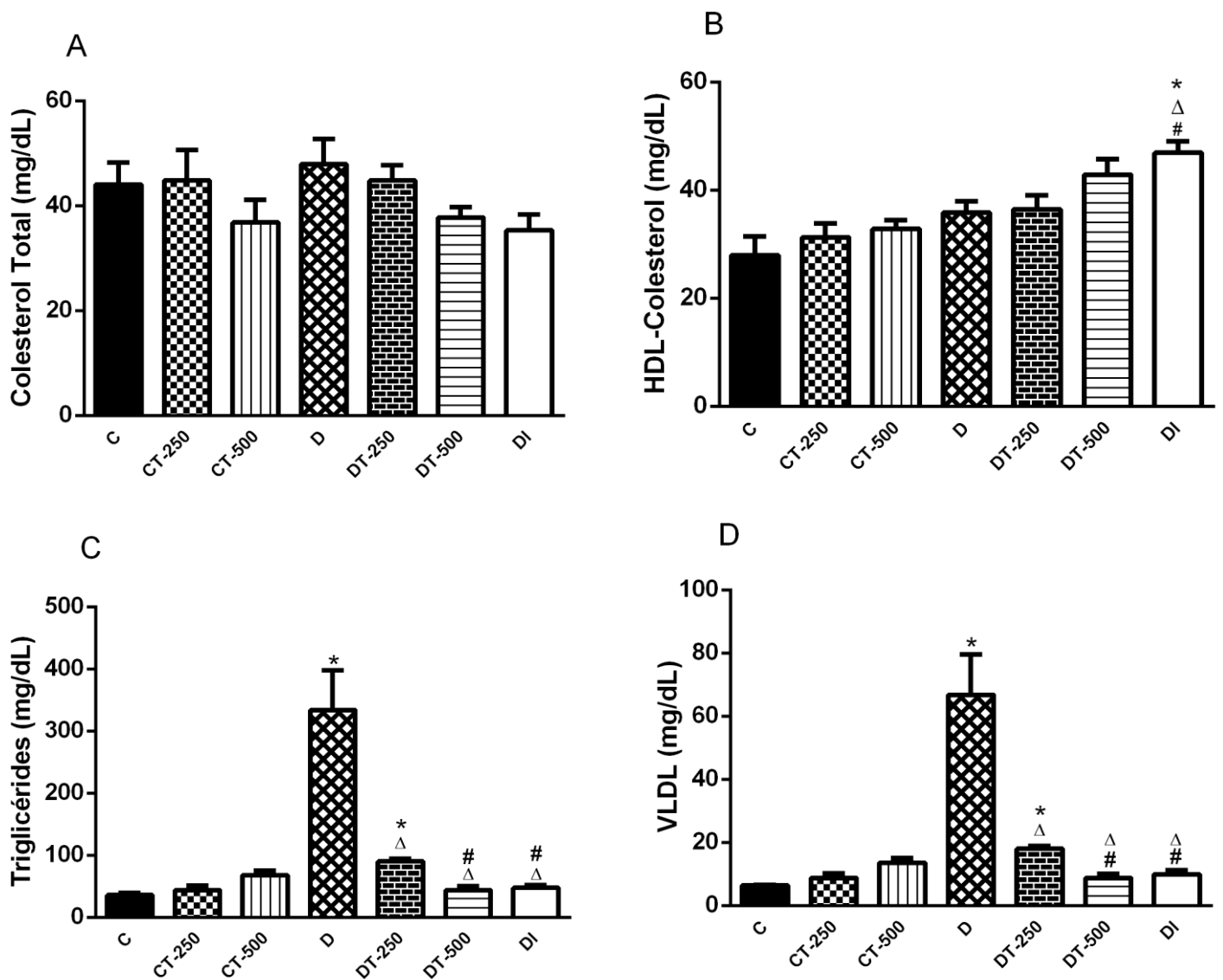


Figura 4. Efeito do extrato da *Spondias tuberosa* sobre o colesterol total (A), HDL-colesterol (B), triglicérides (C), VLDL (D). Dados são expressos como média $\pm$ E.P; número de animais por grupo: 5. Valor de ($p < 0.05$) diferenças significativas quando comparados (*): controle. (#): diabético tratado 250mg/kg. (Δ): diabético e diabético tratado 500mg/kg.

Tabela 1

Efeito do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* sobre proteínas totais, albumina, globulinas, transaminases oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP), glicogênio hepático e muscular dos grupos: controle (C), controle tratado com 250mg/kg do extrato (CT-250mg/kg), controle tratado com 500mg/kg do extrato (CT-500mg/kg), diabético (D), diabético tratado com 250mg/kg do extrato (DT-250mg/kg), diabético tratado com 500mg/kg do extrato (DT-500mg/kg), em experimento subcrônico ao final de 21 dias de tratamento.

Grupos	Proteínas totais (g/dL)	Albumina (g/dL)	Globulina (g/dL)	TGO (U/mL)	TGP (U/mL)	Ureia (mg/dL)	Glicogênio Hepático (%)	Glicogênio Muscular (%)
C	5,8 ± 0,31	2,69 ± 0,19	3,1 ± 0,23	139 ± 25,1	55,9 ± 4,1	7,99 ± 1,98	4,7 ± 0,57	0,54 ± 0,07
CT-250mg/kg	5,9 ± 0,25	3,5 ± 0,56	2,4 ± 0,37	105 ± 2,2	48,6 ± 7,4	6,32 ± 0,34	3,9 ± 0,17	0,48 ± 0,01
CT-500mg/kg	5,9 ± 0,18	3,47 ± 0,67	3,2 ± 0,30	115 ± 13,1	45,7 ± 2,7	5,53 ± 0,21	4,9 ± 0,12	0,52 ± 0,08
D	4,7 ± 0,54	2,35 ± 0,09	2,3 ± 0,58	247 ± 27,9*	393 ± 9,1*	123,80 ± 28,64*	1,8 ± 0,31*	0,45 ± 0,04
DT-250mg/kg	5,1 ± 0,44	2,18 ± 0,26	2,9 ± 0,41	256 ± 20,7*	360 ± 51,8*	90,90 ± 10,33**	1,9 ± 0,20*	0,69 ± 0,11
DT-500mg/kg	5,3 ± 0,71	2,79 ± 0,07	2,9 ± 0,68	182 ± 19,7 ^{#Δ}	231 ± 19,5 ^{**Δ}	24,49 ± 5,04 ^{**Δ}	4,0 ± 0,41 ^{#Δ}	0,51 ± 0,07
DI	4,3 ± 0,58	2,31 ± 0,22	1,9 ± 0,45	236 ± 10,8	187 ± 60,8 ^{**Δ}	12,21 ± 1,06 ^{#Δ}	2,7 ± 0,56	0,50 ± 0,07

Dados são expressos como média ± E.P. Análise de variância (ANOVA). Número de animais por grupo: 5. ($p < 0,05$)

(*): diferença do controle (C). (#): diferença do diabético tratado 250mg/kg (DT-250mg/kg). (Δ): diferença do diabético (D).

Tabela 2

Efeito do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* sobre o ganho ponderal, peso dos tecidos coração, fígado, rins normalizados pelo comprimento da tibia, tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal, músculos tibial anterior, sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) dos grupos: controle (C), controle tratado com 250mg/kg do extrato (CT-250mg/kg), controle tratado com 500mg/kg do extrato (CT-500mg/kg), diabético (D), diabético tratado com 250mg/kg do extrato (DT-250mg/kg), diabético tratado com 500mg/kg do extrato (DT-500mg/kg),

Grupos	Ganho ponderal	Tíbia (mm)	Coração (mg/mm)	Fígado (mg/mm)	Rins (mg/mm)	Retroperitoneal (mg/mm)	Epididimal (mg/mm)	Tibial (mg/mm)	Sóleo (mg/mm)	EDL (mg/mm)
C	100 ± 11,7	38,9 ± 0,22	25,4 ± 1,2	276 ± 16,9 [§]	65,1 ± 2,8	66,2 ± 8,4 [*]	62,7 ± 2,9	14,6 ± 1,2	0,76 ± 0,06	0,98 ± 0,04
CT-250mg/kg	80,3 ± 17,3	36,8 ± 0,30	30,1 ± 1,1	265 ± 12,3 [§]	66,5 ± 4,4	44,1 ± 7,3 [*]	62,5 ± 1,3	14,8 ± 0,7	0,67 ± 0,03	0,97 ± 0,02
CT-500mg/kg	109 ± 8,5	38,6 ± 0,35	29,6 ± 0,44	330 ± 45,1	74,5 ± 2,4	68,1 ± 6,7 [*]	78,9 ± 7,1	15,4 ± 0,5 ^{#Δ}	0,82 ± 0,07	0,94 ± 0,06
D	7,3 ± 14,2	38,2 ± 0,44	20,1 ± 1,13	249 ± 10,1 [§]	66,7 ± 3,8	25,4 ± 0,9 [*]	38,6 ± 9,1 [*]	10,3 ± 1,4 [*]	0,56 ± 0,03 ^{*§}	0,60 ± 0,06 [*]
DT-250mg/kg	15,4 ± 5,9 [*]	37,8 ± 0,37	19,9 ± 0,56	254 ± 13,3 [§]	67,3 ± 0,8	9,9 ± 3,08 [*]	19,9 ± 2,7 [*]	8,7 ± 0,9 [*]	0,64 ± 0,02	0,63 ± 0,02 ^{**}
DT-500mg/kg	36,8 ± 7,7 [*]	37,5 ± 0,65	24,1 ± 1,61	266 ± 15,2 [§]	65,8 ± 2,7	67,3 ± 10,8 ^{**}	65,0 ± 7,4	13,6 ± 0,7 [#]	0,65 ± 0,02	0,86 ± 0,05 [#]
DI	107 ± 16,8	37,8 ± 0,86	24,5 ± 1,7	287 ± 22,6 [§]	63,7 ± 6,1	3,1 ± 0,3 ^{*Δ}	72,7 ± 6,8	15,2 ± 1,3	0,78 ± 0,11	0,99 ± 0,06

diabético tratado com insulina (DI), em experimento subcrônico ao final de 21 dias de tratamento

Dados são expressos como média ± E.P. Análise de variância (ANOVA). Número de animais por grupo: 5. ($p < 0,05$)

(*): diferença do controle (C). (#): diferença do diabético tratado 250mg/kg (DT-250mg/kg). (Δ): diferença do diabético (D) e diabético tratado 500mg/kg (DT-500mg/kg). (§): diferença do diabético tratado 500mg/kg (DT-500mg/kg). (+): diferença do diabético insulina (DI). (&): diferença do controle tratado 500mg/kg (CT-500mg/kg).

Referências

- Abdul-Ghani, Muhammad A., Norton, L., De Fronzo, R.A. 2011. Role of Sodium-Glucose Cotransporter 2 (SGLT 2) Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, 32(4):515–531.
- Adeneye, A.A., 2012. The leaf and seed aqueous extract of *Phyllanthus amarus* improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 144, 705–711.
- Albuquerque U.P., Medeiros, P.M., Almeida, A.L.S., Monteiro, J.L., Lins Neto, E.M.F., Melo, J.G., Santos J.P. 2007. Medicinal plants of the caatinga(semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol*. 114: 325-354.
- Alencar, L.C.B., Chaves, T.P., Santos J.S., Nóbrega, F.P., Araújo, R.M., Santos, V.L., Felismino, D.C., Medeiros, A.C.D. 2015. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. *Rev Ciênc Farm Básica*.
- Attanayake, A.P., Jayatilaka, K.A.P.W., Pathirana, C. Mudduwa, L.K.B. 2014. Antihyperglycaemic, antihyperlipidaemic and β cell regenerative effects of *Spondias pinnata* (Linn. f.) Kurz. bark extract on streptozotocin induced diabetic rats. *European Journal of Integrative Medicine*. 1-9.
- Barbosa H.M., Nascimento, J. N., Araújo, T. A. S., Duarte, F. S., Albuquerque, U. P., Vieira, J. R. P., Santana, E. R. B, Yara, R., Lima, C. S. A., Gomes, D. A., Lira, E. C. 2016. Acute Toxicity and Cytotoxicity Effect of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark: Hematological, Biochemical and Histopathological Evaluation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*.
- Carroll, N.V., Longley R.W., Roe J.H. 1956. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem*. 583-93.
- Da Silva Siqueira, E.M., Félix-Silva, J., de Araújo, L.M., Fernandes, J.M., Cabral, B., Gomes, J.A., de Araújo Roque, A., Tomaz, J.C., Lopes, N.P., Pedrosa, M.F.F., Giordani R. B., Zucolotto S.M. 2016. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. *Biomed Chromatogr*. Apr 8.
- Domínguez-Mendoza, E. A., Cornejo-Garrido, J., Burgueño-Tapia, E., Ordaz-Pichardo C. 2016. Antidiabetic effect, antioxidant activity, and toxicity of 30,40-Di-Oacetyl-cis-khellactone in Streptozotocin-induced diabetic rats. 26, 4086–4091.

Dubowski, K. M. 1962. An o-toluidine method for body fluid glucose determination. Clin Chem 9: 215-235.

Ernst, E., 1997. Plants with hypoglycemic activity in humans. Phytomedicine 4, 73–78.

Ghosh, S., Suryawansi, S. A. 2001. Effect of Vinca rose a extracts in treatment of alloxan diabetes in male albino rats. Indian J.Exp.Biol.39, 748–759.

Gregoris, E., Lima, G. P. P., Fabris, S., Bertelle, M., Sicari, M., Stevanato, R. 2013. Antioxidant Properties of Brazilian Tropical Fruits by Correlation between Different Assays. Biomed Res Int. 132759.

Hemmati, M., Zohoori, E., Mehrpour, O., Karamian, M., Asghari, S., Zarban, A., Nasouti, R. 2015. Anti-atherogenic potential of jujube, saffron and barberry: anti-diabetic and antioxidant actions. EXCLI Journal. 14:908-915.

Ibrahim, M.A., Habila J.D., Koorbanally, N.A., Islam M.S. 2016. Butanol fraction of *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don leaves enhance pancreatic β -cell functions, stimulates insulin secretion and ameliorates other type 2 diabetes-associated complications in rats J Ethnopharmacol. 13;183:103-11.

IDF. 2015. Diabetes atlas www.idf.org. Bruxelas.

Iweala, E. E. J., Oludare, F.D. 2011. Hypoglycemic Effect, Biochemical and Histological Changes of *Spondias mombin* Linn. and *Parinari polyandra* Benth. Seeds Ethanolic Extracts in Alloxan-induced Diabetic Rats. J. of Pharmacology. 6 (2): 101-112.

Kaur, G., Invally, M., Chintamaneni M. 2016. Influence of Piperine and Quercetin on Antidiabetic Potential of Curcumin. J Complement Integr Med. 0016.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia (2008) 51:216–226.

Lins Neto, E.M.F., Almeida, A.L.S., Peroni, N., Castro, C. C., Albuquerque, U.P. 2013 Phenology of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) under different landscape management regimes and a proposal for a rapid phenological diagnosis using local knowledge. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 9:10.

Lira E. C., Santos V. L., Silva J. A. 2005. Avaliação da atividade antiulcerogênica do extrato bruto da raiz da *Cassia occidentalis* L. (Mangerioba). Rev Bras Farm. 86: 53-56.

Melo, E.A.; Andrade, R.A.M.S. 2010. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro. Alimentos e Nutrição. 21, 453-457.

- Oladayo, M. I. 2016. Nigerian propolis improves blood glucose, glycated hemoglobin A1c, very low-density lipoprotein, and high-density lipoprotein levels in rat models of diabetes. *J Intercult Ethnopharmacol.* 6, 3.
- Oliveira, H. C., Santos, M. P., Grigulo, R., Layla L. Lima, L. L., Martins, D. T. O., Lima, J. C. S., Stoppiglia, L. F., Lopes, C. F., Kawashita, N. H. 2008. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 115, 515–519.
- Pandey M. M., Rastogi, S., Rawat A. K. 2013. Indian traditional ayurvedic system of medicine and nutritional supplementation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 376327.
- Patel, D. K., Prasad, S. K., Kumar, R., Hemalatha, S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pac J Trop Biomed;* 2(4): 320-330.
- Rosenblit, P. D. 2016. Common medications used by patients with type 2 diabetes mellitus: what are their effects on the lipid profile? *Cardiovasc Diabetol.* 15:95.
- Shen, S.C., Cheng, F.C., Wu, N.J. 2008. Effect of guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf soluble solids on glucose metabolism in type 2 diabetic rats. *Phytother Res.* 22(11):1458–64
- Somani, R. Kasture, S. Singhai, A. K. 2006. Antidiabetic potential of *Butea monosperma* in rats. *Fitoterapia.* 77: 86-90.
- Taskinen, M. R., Boren J. 2015. New insights into the pathophysiology of dyslipidaemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 239: 483-95.
- Venkatachalam, P., Manickam, T., Bang, KS., Velmurugan, P., Oh, BT. 2016. Antidiabetic potential of bioactive molecules coated chitosan nanoparticles in experimental rats. *International Journal of Biological Macromolecules.* 92, 63–69.
- WHO, Diabetes Fact Sheet No. 312; World Health Organization, 2015.
- Widyawati T, Yusoff N. A., Asmawi M. Z., Ahmad M. 2015. Antihyperglycemic Effect of Methanol Extract of *Syzygium polyanthum* (Wight.) Leaf in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. 14;7(9):7764-80.
- Yusoff, N.A., Ahmad, M. Al-Hindi B. Widyawati T. Yam M. F., Mahmud R., Razak, K. N. A., Asmawi M. Z. 2015. Aqueous Extract of *Nypa fruticans* Wurmb. Vinegar Alleviates Postprandial Hyperglycemia in Normoglycemic Rats. *Nutrients.* 7, 7012-7026.
- Yankuzo, H., Ahmed Q. U., Santosa, R. I., Akter, S. F. U., Talib, N. A. 2011. Beneficial effect of the leaves of *Murraya koenigii* (Linn.) Spreng (Rutaceae) on diabetes-induced renal damage in vivo. *J Ethnopharmacol.* 135, 88–94.

ANEXO B - Acute toxicity and cytotoxicity effect of ethanolic extract of *Spondias tuberosa* arruda bark- hematological, biochemical and histopathological evaluation.



Anais da Academia Brasileira de Ciências (2016) 88(3 Suppl.): 1993-2004
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620160041>
www.scielo.br/aabc

Acute Toxicity and Cytotoxicity Effect of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark: Hematological, Biochemical and Histopathological Evaluation

HUMBERTO M. BARBOSA¹, JAILSON N. DO NASCIMENTO¹, THIAGO A.S. ARAÚJO¹, FILIPE S. DUARTE¹, ULYSSES P. ALBUQUERQUE², JEYMESSON R.C. VIEIRA³, EDSON R.B. DE SANTANA⁴, RICARDO YARA⁴, CLÁUDIA S.A. LIMA⁴, DAYANE A. GOMES⁴ and EDUARDO C. LIRA¹

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

²Departamento de Histologia e Embriologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³Laboratório de Etnobotânica Aplicada, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brasil

⁴Departamento de Biofísica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Manuscript received on January 26, 2016; accepted for publication on May 13, 2016

ABSTRACT

Spondias tuberosa Arruda, popularly named as umbu, is native from savanna-like vegetation and widely used for medicinal purposes, however, the toxicological profile is not available yet. This study evaluated the phytochemical profile and acute toxicity and citotoxicity of Ethanolic Extract of *Spondias tuberosa* Arruda Bark (EES_{tb}) in hematological, biochemical and histopathological parameters. Female Wistar rats were divided into: control (C) and animal treated single doses of 300mg/Kg (EES_{tb,300}) or 2.000mg/kg body weight (EES_{tb,2000}) of the EES_{tb}. After 24 hours and 14 days from gavage, the behavior, hematological, biochemical and histopathological parameters were assayed. Cytotoxicity effect was evaluated on HEP-2 cell lines. Neither EES_{tb,300} nor EES_{tb,2000} produced mortality nor changes in body weight during the 14-days of observation, but EES_{tb,2000} reduced quietly the food and water intake as well as locomotor activity at first day. There were no changes in macroscopic, histopathological, biochemical and hematological parameters. EES_{tb} in concentrations of 6.25- 50µg ml⁻¹ on HEP-2 cell did not produce cytotoxic effect. These results suggest that EES_{tb} did not cause acute toxicity and cytotoxic, suggesting a good safety rate for *Spondias tuberosa* Arruda.

Key words: Acute toxicity, cytotoxicity, phytochemistry, safety, *Spondias tuberosa* Arruda, toxicology.

INTRODUCTION

Collectively plants produce a plethora of low-molecular mass natural product, also known as secondary metabolites, which play a role in the

defense of plants against stressing conditions or pathological infections. These molecules may produce hepatotoxicity, renal failure, allergic reactions (Nortier and Vanherweghem 2007), or may cause death in humans or animals; even if ingested in small amounts. The general

Correspondence to: Eduardo Carvalho Lira
E-mail: eduardoclira@gmail.com

acceptability of medicinal plants has been limited by a lack of defined chemical composition, dose used, and toxicological profile to evaluate their safety (Deng et al. 2013). Unfortunately, there are few data available about toxicology for the most commonly used plants remedies.

The Anacardiaceae family of flowering plants has around 81 genera and 800 species, which are economically relevant due to agriculture and food production (Aguilar-Barajas et al. 2014). However, there are reports of poisonous species such as *Toxicodendron radicans* (L.) Kuntze (Tadjimukhamedov et al. 2012). Other members from Anacardiaceae show analgesic, hypoglycemic, anti-inflammatory effects in human and animal (Ojewole 2005), and antimicrobial effect in rats (Melo et al. 2014).

Seventeen species including seven taxa in the Neotropics and ten species in the Asian tropics belongs to genus *Spondias* L. (Miller and Schaal, 2005). Among them, *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), popularly named as umbu, is one of the most important endemic species from Brazilian semi-arid region (Lins Neto et al. 2012). It is native from savanna-like vegetation and widely for nourishment, medicinal purposes and fuel wood (Lins Neto et al. 2010). Its principal product is the fruit which acid taste is widely appreciate, however, the leaves and barks are still used in folk medicine to treatment of different diseases such as diabetes, lipids disturbance, diarrhea, inflammation, conjunctivitis, venereal diseases, menstrual colic disturbances, placental delivery, renal infection, throat afflictions and antiemetic (De Sousa Araújo et al. 2008, Lins Neto et al. 2010).

Despite the wide use of *S. tuberosa* in semi-arid region from Brazil, there have been currently no reports published about their toxicological profile. This study aimed to evaluate the acute toxicity and the cytotoxicity of the ethanolic extract of *S. tuberosa* bark on behavioral, metabolic,

hematological, biochemical, and histopathological parameters in rodents and cytotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Barks from 3 different trees of *Spondias tuberosa* were collected in February 2013 in Altinho city (08° 35' 16.1" S X 36° 05' 36.1" W), state of Pernambuco/Brazil and identified by Dr. Ulysses Paulino Albuquerque and a voucher specimen (#48652) is deposited at the Herbarium of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE).

Preparation of Extract

The ethanolic extract of *S. tuberosa* bark (EES_{tb}) was prepared by maceration from dried and powdered barks (714g) in Ethanol 90% at room temperature (28°C) overnight. The solvents were removed by rotary evaporation. The yield (w/w) of the EES_{tb} was 15.6% in terms of newly collected plant material. After preparation, the dried powder extract was stored at room temperature. The EES_{tb} was used for preliminary phytochemical analysis and toxicological assays.

EXPERIMENTAL ANIMALS AND ETHICAL STATEMENT

Female Wistar rats (220±10g) were obtained from Animal House of Physiology and Pharmacology Department at Federal University of Pernambuco. The experiment time was performed according to Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines 423 (2001). Rats were housed in a room with 12-12 light-dark cycle, 22±3°C and were given free access to water and conventional lab chow diet (Purina, Labina®, Brazil). All experiments were performed between 8:00 and 10:00 am. The protocols for these experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (CEUA-UFPE,

process #: 23076.038781/2014-31) and conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research.

PRELIMINARY PHYTOCHEMICAL ANALYSIS

Preliminary phytochemical analysis of the EESTb was carried by Thin Layer Chromatography (TLC) on silica gel developed by different solvent systems according to the method proposed by Wagner and Bladt (1996). It was verified the presence or absence of flavonoids, cinnamic acid derivatives, phenylpropane glycosides, condensed tannins, coumarins, alkaloids, monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, steroids and naphthoquinones. Saponin was detected from foaming test. Foams were produced when the extract (0.5g) was mixed and shaken with water (2 mL) for 30s and remained for 15 minutes to confirm the presence of saponins.

PHENOLIC CONTENT ASSAY

The concentration of total phenol of EESTb was determinate by a spectrophotometric method using the Folin-Ciocalteu reagent (Singleton et al. 1999). The ethanolic extract with concentration of 1 mg/mL was applied on this analysis. The reaction was prepared with 0.5 mL of ethanolic extract solution, where was added 2.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent (10%) and 2.5 mL of NaHCO_3 (7.5%). The samples were prepared in triplicate. Blank was prepared concomitantly, from 0.5 mL of methanol, 2.5 mL of Folin-Ciocalteu (10%) and 2.5 mL of NaHCO_3 (7.5%). The samples were incubated on a thermostatic bath at 45°C for 45 min. The absorbance was measured at 765 nm (λ) for each repetition from triplicate and the media was calculated. The same procedure was repeated to gallic acid standard solution and a calibration curve was determinate. The total phenol content was expressed on terms of gallic acid equivalent (mg of GAE/g of extract).

FLAVONOID CONTENT ASSAY

The determination of flavonoids was performed according to Woisky and Salatino (1998) adapted method. EESTb (1mg/mL), aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) at 5% dissolved in methanol (1mL) and methanol (2 mL) were added in test-tubes. Blank sample was prepared using 4 mL of methanol and 1 mL of $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Samples remained in dark for 30 minutes and the absorbance was measured at 425 nm. Standard solutions of quercetin in concentrations of 50, 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g/mL}$ were used to obtain the calibration curve. The flavonoid content was expressed in terms of quercetin equivalent (mg of QUE/g of extract).

CYTOTOXICITY ASSAY

The human epidermoid cancer cells (HEp-2 cells) were investigated by the MTT method [3-(4,5-dimethyl (thiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide)]. Briefly, HEp-2 cells were trypsinized, counted and prepared in a suspension with 10^5 cells/mL of DMEM and distributed in a plate with 96-wells, which was incubated at 37°C in a humidified atmosphere for 24 h. The EESTb was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) in concentrations of 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and 31.2 $\mu\text{g/mL}$ and put in the wells with the HEp-2 cells. Extracts with concentrations more than 30 mg/mL are considered cytotoxic (Geran et al. 1972). Each concentration was tested in quadruplicate. DMEM with DMSO was used as control. After 72 h, 25 μL of MTT and 5 mg/mL of PBS were added to the wells and the plate was incubated for 2h. The optical density was measured at 550 nm by using a microplate reader (Elx800, BioTek®, USA).

ACUTE TOXICITY EVALUATION

Acute toxicity effect of EESTb was performed in accordance with Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guidelines

423 (2001). After 5 days of acclimation in metabolic cage, nulliparous and non-pregnant female rats were fasted overnight and weighted before extract administration. The EES_{tb} used in the assay was dissolved in distilled water and administered by gavage in rats at single dose using a animal feeding needles (100µL/100g b.w.). Animals were randomly divided into 3 groups with 3 animals each: (a) control group (C) which received only distilled water, (b) 300mg/Kg (EES_{tb}₃₀₀) and (c) 2.000mg/Kg (EES_{tb}_{2.000}). There is no toxicological information about *Spondias tuberosa*, in accordance with OECD 4003 it was evaluated 2 doses. To metabolic, hematological, biochemical and histopathological analysis were used five animals/group.

During the first 4 hours, the glycaemia and body temperature were monitored. All animals were closely observed for skin, fur, eyes, mucous membrane toxic effects and behavior patterns, lethargy, sleep, diarrhea, tremors, salivation, convulsion, coma, motor activity, and death.

METABOLIC PARAMETERS

All animals were monitored for 14 days after treatment which were kept in metabolic cage to evaluate, urinary volume, food and fluid intake daily as well as body weight gain.

BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL ANALYSIS

Blood sampling

At 24 hours and 14 days after gavage, fasting rats were anesthetized and blood was drawn from retro-orbital route with or without heparin for hematological and serum biochemical analysis, respectively.

HEMATOLOGICAL ANALYSIS

Hematological parameters included red blood cells (RBC), mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin (Hb), mean corpuscular hemoglobin

(MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets, white blood cells (WBC), lymphocytes (LYM) and granulocytes (GRAN) were determined by an automatic hematology analyzer (SDh-20, Labtest®, Brazil).

SERUM BIOCHEMISTRY

Biochemical analysis were performed for determination the following parameters: alanine (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total protein (TP), albumin (ALB), AST/ALT and albumin/globulin ratio (A/G), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE). Globulin was obtained from the difference between total protein and albumin.

ORGAN WEIGHT AND HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS

At 14th day, all female rats were necropsied after blood collection for anatomical localization and gross examination of visible changes in the organs (aspect, color and size). Selected organs including brain, lungs, heart, liver, kidney, uterus and ovaries were carefully excised and trimmed of fat and connective tissue before being weighed. Liver and kidney were collected and their weight determined and expressed by 100g of rat. The specimens of vital organs (kidney and liver) were fixed in 10% formalin buffer solution for 24 hours at room temperature and washed for 4 hour with tap water. They were then dehydrated step-wise using 70~100% ethanol. Dehydrated tissues were turned transparent through addition of xylene. Tissues were added to pre-heated paraffin for sufficient infiltration, cooled, and made into paraffin blocks before cutting into 5 µm sections using a microtome (Leica® RM 2025, Heidelberg, Germany). The paraffin was removed and specimens were dehydrated for observation with inverted optical microscope (Leica®, Heidelberg, Germany) coupled to a video camera (Leica® DFC 280, Wetzlar, Germany) and a computer monitor

after hematoxylin-eosin dyeing. The specimens of vital organs were analyzed by an experienced pathologist for any cellular damage or change in morphology and photographed. The organ weight was and expressed by 100g of rats.

STATISTICAL ANALYSIS

The cytotoxicity analysis was performed by Shapiro-Wilk test using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 21 with P value < 0.05 . *In vivo* data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. The one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test was employed to analyze the data between treated groups (EES₃₀₀ and EES_{2,000}) and their respective control groups followed. P value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS

Preliminary phytochemical screening of EES₃₀₀ showed the presence of flavonoids, triterpen,

tanins, steroid and sponins and absence of cinnamic derivatives, phenylpropane glycosides, coumarins, alkaloids, naphthoquinones, monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In addition, total phenolics content varied from 20.507 to 52.747 mg of GAE of EES₃₀₀ and flavonoids content varied from 1.457 to 10.325 mg of QUE of EES₃₀₀ (tables I and II).

GENERAL METABOLIC PARAMETERS

Neither mortality nor severe toxic or side effects were observed during all experimental period (14 days). However, behavior pattern alteration, such as reduction in locomotor activity at first day was detected at higher dose used.

There were no differences in body weight gain and total food intake between the control and EES₃₀₀ treated rats in doses of 300 and 2.000 mg/Kg, however, the extract at the higher dose reduced quietly the food (45%) and water (50%) intake at 1st day, without any alteration in urinary volume (Figure 1).

TABLE I
Results from assays to determine the total phenolic content from EES₃₀₀ expressed on terms of gallic acid equivalent (mg of GAE/g of extract).

Extract concentration Repetition	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
A	52.780	37.898	19.431
B	53.119	31.468	20.965
C	52.343	32.093	21.127
Media	52.747	33.819	20.507

TABLE II
Results from flavonoid content from EES₃₀₀ expressed on terms of quercetin equivalent (mg of QUE/g of extract).

Extract concentration Repetition	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
A	10.752	4.475	1.525
B	9.648	4.366	1.258
C	10.576	4.403	1.590
Media	10.325	4.414	1.457

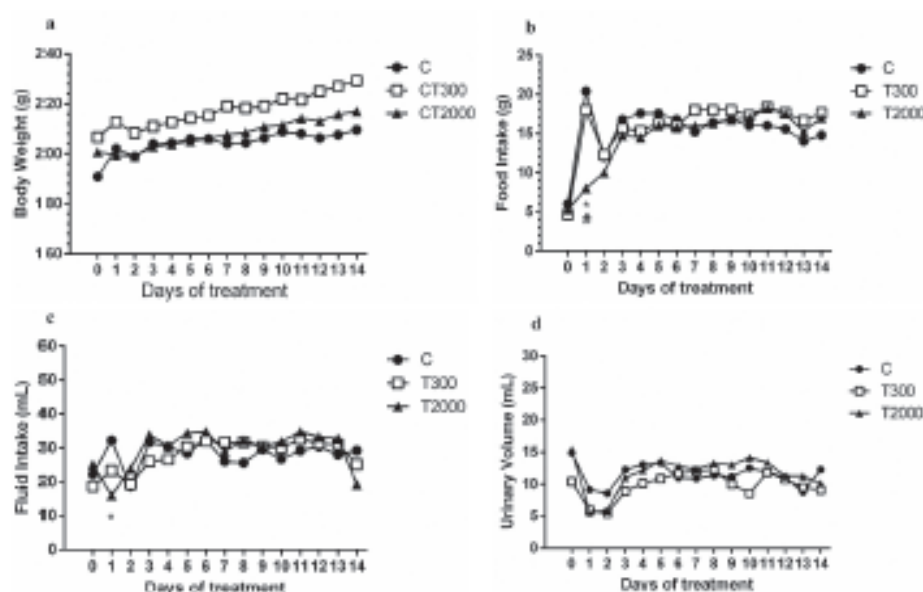


Figure 1 - Effects of acute oral treatment with the EESTb on (a) body weight; (b) food intake; (c) fluid intake and (d) urinary volume of control (C), treated with 300 mg/kg (EESTb₃₀₀) and 2.000 mg/kg (EESTb_{2,000}) groups during 14 days.

ORGAN WEIGHT AND HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS

The EESTb did not show statistical significant differences on liver and kidney weights. The control (2.9 ± 0.1 mg/100g and 0.38 ± 0.01 mg/100g), EESTb₃₀₀ (3.3 ± 0.2 mg/100g and 0.38 ± 0.01 mg/100g) EESTb_{2,000} (3.6 ± 0.3 mg/100g and 0.39 ± 0.02 mg/100g). There were not morphological changes in liver and kidney of rats comparing with the control group. The histopathological analysis of liver and kidney after acute treatment with EESTb at both doses showed a normal kidney and liver architecture. The cords of hepatocytes (CH) very well arranged, sinusoid capillaries (S) and central veins (CV) without alterations (Figure 2: a, b and c). Kidney architecture with glomerulus (G) surrounded by the Bowman's capsule (BC), Renal Tubules (RT) without any inflammatory changes when compared with the control group (Figure 2: c, d and e).

HEMATOLOGICAL AND SERUM BIOCHEMICAL ANALYSIS

The serum hematological and biochemical data on 1st and 14th days were summarized in tables III

and IV, respectively. There was no difference in the hepatic (ALT, AST, ALP, TP, ALB, GLO, ALT/AST and A/G ratio) and renal (creatinine and urea) function among control and treated groups, as well as in any hematological index analyzed at 1st and 14th days.

CYTOTOXICITY

EESTb in concentrations of 31.2, 62.5, 125, 250 and 500 μ g/mL on HEp-2 cell lines did not produce any cytotoxic effect in cell lines when compared with control DMEM and DMSO. However, the EESTb treatment showed an increase in cell number in all concentrations mainly at 250 μ g/mL comparing to the control group (Figure 3).

DISCUSSION

S. tuberosa Arruda is a tropical plant which plays an important role in Brazil's semi-arid region. Umbu fruit is large appreciable mainly by the taste characteristic, but also its medicinal use has been reported in the literature (Lins Neto et al. 2010, Da Silva et

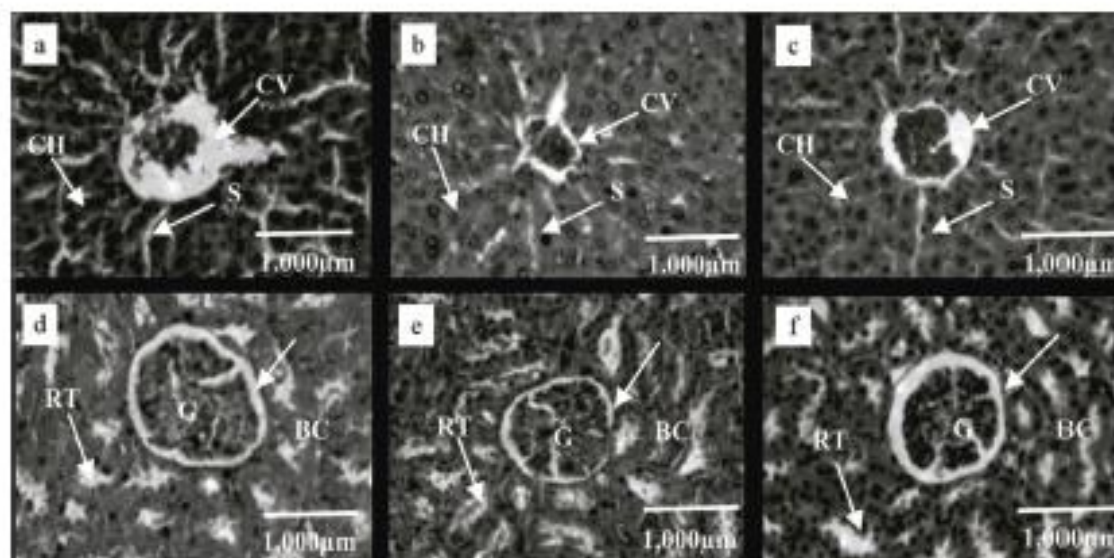


Figure 2 - Photomicrographs of hepatic tissue of rats: (a) Control group; (b) EESTb₃₀₀; (c) EESTb_{2,000} and of renal tissue of rats: (d) Control group; (e) EESTb₃₀₀; (f) EESTb_{2,000}. Formalin fixed, HE- stained. CH - Cords of Hepatocyte; S - Sinusoids capillaries; CV - Central Veins. G - Glomerulus; RT - Renal Tubules; Bowman's capsule (BC). Magnification 200X.

TABLE III

Effects of acute oral treatment with the EESTb on hematological parameters of control (C), treated with 300 mg/kg (EESTb₃₀₀) and 2.000 mg/kg (EESTb_{2,000}) groups at 1st and 14th day after gavage.

1 st day	Unit	Control	EESTb ₃₀₀	EESTb _{2,000}
RBC	10 ¹² /L	7.5±0.2	7.0±0.2	6.5±0.8
MCV	fL	56.4±0.8	54.2±0.3	55.2±0.6
Hg	g/dL	15.4±0.4	14.4±0.3	15.0±0.6
MCH	pg	20.5±0.2	21.0±0.2	20.6±0.1
MCHC	g/dL	36.4±0.3	37.8±0.3	37.8±0.3
HCT	%	42.3±1.1	38.1±0.9	40.0±1.6
WBC	10 ⁹ /L	6.3±0.4	7.2±0.6	6.8±0.6
LYM	10 ⁹ /L	5.7±0.2	6.7±0.5	6.4±0.8
14 th day				
RBC	10 ¹² /L	7.5±0.3	7.5±0.3	7.7±0.1
MCV	fL	57.0±1.0	55.7±0.4	56.8±0.4
Hg	g/dL	15.7±0.5	15.9±0.6	15.8±0.2
MCH	pg	21.0±0.2	20.4±0.2	20.6±0.1
MCHC	g/dL	36.9±0.7	36.4±0.3	36.2±0.2
HCT	%	42.6±1.7	43.7±2.0	43.7±0.6
WBC	10 ⁹ /L	4.5±0.3	5.4±0.9	5.5±0.8
LYM	10 ⁹ /L	4.2±0.3	4.9±0.8	4.4±0.4

TABLE IV
Effects of acute oral treatment with the EESTb on biochemical parameters of control (C), treated with 300 mg/kg (EESTb₃₀₀) and 2.000 mg/kg (EESTb_{2.000}) groups at 1st and 14th day after gavage.

1 st day	Unit	Control	EESTb ₃₀₀	EESTb _{2.000}
AST	U/L	148.2±9.3	129.08±8.21	111.24±7.52
ALT	U/L	46.8±2.8	63.6±6.7	54.9±7.7
AST/ALT ratio	U/L	2.8±0.2	2.2±0.1	2.2±0.1
ALP	U/L	40.32±6.67	48.61±8.76	35.38±8.52
Albumin	g/dL	2.74±0.13	2.54±0.9	2.93±0.9
Total protein	g/dL	5.97±0.28	6.74±0.19	5.73±0.36
Globulin	g/dL	3.22±0.36	4.25±0.22	2.81±0.46
A/G ratio	g/dL	0.90±0.11	0.64±0.06	1.01±0.17
Urea	mg/dL	44.81±7.80	35.52±1.25	33.61±2.15
Creatinine	mg/dL	0.28±0.03	0.29±0.5	0.31±0.05
14 th day				
AST	U/L	138.68±6.38	116.27±12.30	129.21±9.45
ALT	U/L	48.9±4.55	43.7±11.2	45.4±6.7
ALT/AST ratio	U/L	2.7±0.3	2.5±0.3	3.0±0.3
ALP	U/L	29.71±3.19	26.40±2.74	42.96±7.91
Albumin	g/dL	2.60±0.08	2.44±0.18	2.61±0.13
Total protein	g/dL	6.29±0.20	6.56±0.19	6.33±0.20
Globulin	g/dL	3.69±0.23	4.12±0.23	3.71±0.12
A/G ratio	g/dL	0.73±0.06	0.65±0.07	0.71±0.03
Urea	mg/dL	47.16±3.30	46.28±2.83	42.32±2.48
Creatinine	mg/dL	0.42±0.06	0.47±0.01	0.49±0.03

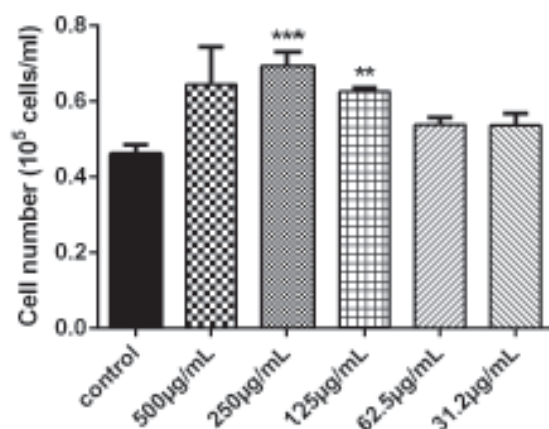


Figure 3 - Effects of EESTb on HEp-2 Cell number *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ vs control 216x161mm.

al. 2012). The importance of *S. tuberosa* in folk medicine, human nutrition and its pharmacological potential makes this toxicological evaluation on it imperative. In literature, there is no information

about safety of *S. tuberosa* on medicinal propose. Here these results demonstrated that EESTb showed toxicity effects neither *in vivo* nor *in vitro*.

In this study, the preliminary phytochemical screening of EESTb showed the presence of flavonoids, triterpen, tanins, steroid and sponins and absence of cinnamic derivatives, phenylpropane glycosides, coumarins, alkaloids, naphthoquinones, monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In addition, total phenolics content varied from 20.507 to 52.747 mg of GAE of EESTb and flavonoids content varied from 1.457 to 10.325 mg of QUE of EESTb as soon in tables I and II, respectively. Reports have shown hydrolysable tannins, flavones, flavonoids, and phenols in extracts of leaves and fruits of *Spondias tuberosa* (De Sousa Araújo et al. 2012, Da Silva et al. 2012, Zielinski et al. 2014). In addition, Da Silva et al. (2012) detected by diode array detectors (HPLC-PDA) rutin,

ellagic acid and quercetin. Here, we confirmed the presence of total phenolics and flavonoids through spectrophotometric methods. Previous studies have shown the occurrence of those phytochemicals in fruits and leaves of *S. tuberosa* (Zielinski et al. 2014, Da Silva et al. 2012), but until our acknowledgment this is the first report in bark.

Analyses of several physiological parameters such as behavior, body weight, food intake, biochemical, hematological and histological analysis are used to evaluate toxicity in animals and humans (Ahmad et al. 2013). Neither mortality nor severe toxic or clinical signs were observed during all experimental period. There were no differences in body weight gain and total food intake between the control and EESTb₃₀₀ and EESTb_{2,000} groups (Figure 1). However, the extract at the higher dose reduced the food (45%) and water (50%) intake at 1st day, without any alteration in urinary volume intake (Figure 1). At first day, reduction in locomotor activity was induced by EESTb_{2,000}. Notwithstanding, there were no difference among the groups on clinical signs patterns, such as salivation and diarrhea.

Considering that flavonoid has been shown to exert effects on CNS, mainly both sedative and analgesics (Fernández et al. 2006), it can be speculated that the transient reduction in food and water intake could be associated to the flavonoids content in EESTb and their effects on CNS. It is well known that gamma aminobutyric acid (GABA), the major inhibitory neurotransmitter in the CNS, is vital for the overall balance between neuronal inhibition and excitation through its interaction with specific heteromeric GABA-gated chloride channels receptor. Many studies have been correlated to the affinities of diverse natural and synthetic flavonoids for the benzodiazepine binding sites located to the GABA receptors to their pharmacological effects *in vivo* such as anticonvulsant, sedative or anxiolytic effect (Viola et al. 1995, Griebel, et al. 1999, Gouteman et al.

2003, Jäger and Saaby, 2011). Flavonoids, such as apigenin, quercetin and chrysin, are sedative in rodents (Gouteman et al. 2003, Jäger and Saaby 2011) and its probably occurrence in EESTb could, at least in part, explain the reduction in food and water intake and locomotor activity observed at first day in EESTb_{2,000} group. Other experiments must be undertaken to clarify this mechanism.

The hematopoietic system is one the most sensitive target for toxic molecules (Olson et al. 2000). Among important clinical alterations, the haematological parameters provide a reliable index to evaluate health and pathological conditions in human and animal (Gautam and Goel 2014). In this report, both red and white blood cells profile was analyzed as important toxicological index. Our results showed that EESTb neither provoked anemia nor immune system stimulation (table III). Here, we did not observe any haematological toxicity effect and did not interfere or cause any injury to the circulating red and white blood cells or platelets, corroborating the wide safety margin of the EESTb. In addition, EESTb neither modified serum glucose levels nor body temperature (*data not shown*), supporting that EESTb have no toxic effect acutely.

Macroscopical analysis revealed that the EESTb₃₀₀ and EESTb_{2,000} did not cause any effect on organ weight such as kidney and liver. Once that, those organs represent the most sensitive to show toxicity when they are exposed to potential harmful compounds (Olson et al. 2000, Luka et al. 2014), histopathological analysis of both were performed. Acute treatment with EESTb at both doses showed a normal liver architecture with cords of hepatocytes (CH) very well arranged, sinusoid capillaries (S) and central veins (CV) without alterations as well as normal kidney architecture with glomerulus (G) surrounded by the Bowman's capsule (BC). EESTb_{2,000} group showed a minor change in pericapsular space suggesting alteration in glomeruli (Figure 2f). Those changes should be confirmed

by histomorfometric analysis. Renal Tubules (RT) without any inflammatory changes when compared with the control (Figure 2).

It is well established that serum enzymes alanine (ALT) and aspartate (AST) transferase are sensitive biomarkers to evaluate hepatotoxicity. Here, hepatic function has been monitored by the evaluation of the serum level of ALT, AST and phosphatase alkaline (ALP). Hepatocellular necrosis leads to high levels of ALT and AST, which are released from liver into the blood. ALP activity, on the other hand, is related to the functioning of hepatocytes (Pan et al. 2009). In the present study, there were no significant changes in hepatic enzymes, suggesting that the EES_{tb} did not cause any damage to the hepatic functions. Further, no impairment was detected in kidney function marks such as increasing in creatinine and urea levels (table IV).

Albumin and globulin are the most important plasmatic proteins and they represent a good criterion for assessing synthetic liver capacity (Pan et al. 2009). In addition, hepatocellular damage leads a reduction in albumin accompanied by a relative increase in globulins, which decrease A/G ratio (Santhosh et al. 2007). In hepatotoxic conditions, a significant reduction in serum urea was detected due the failure of the liver in converting amino acids and ammonia into urea (Reichen and Paumgartner 1980). In this study, EES_{tb} did not change albumin, globulin and urea levels at first and 14th days of experiment (table IV). Considering that histopathological analysis and microscopy examination did not reveal any insult in liver or kidney histomorphology (Figure 2), our results suggest that the EES_{tb} did not show nephrotoxic and hepatotoxic effects.

It could be speculated that LD₅₀ of EES_{tb} is found to be more than 2.000 mg/Kg (OECD 2001). Substances with LD₅₀ higher than 1.000 mg/Kg by oral route are regarded as being safe or slightly toxic (Garner 1975) and this study shows that EES_{tb} produce little or no short-term effects on

rats. The results suggest that EES_{tb} is safety to the popular use and it makes the species interesting for future pharmacological investigation.

To confirm the safety *in vivo* use of the EES_{tb}, we evaluated the cytotoxicity in HEp-2 cells. This extract did not cause cytotoxicity in any concentrations. On the other hand, EES_{tb} was able to stimulate the HEp-2 proliferation, with a higher effect at 250 µg/mL (Figure 3), suggesting a possible mitogenic mechanism of the extract in HEp-2 cells. Further studies on the mechanism of action of EES_{tb} and its effects on cell lines under laboratory conditions are in progress.

CONCLUSIONS

This study is the first reports in literature that provide preliminary *in vitro* and *in vivo* evidences about the *Spondias tuberosa* safety. The data show that EES_{tb} did not cause any death or acute toxicity signs, as well as also showed mitogenic effect, suggesting the EES_{tb} as a promise to future biological investigation. The species is widely used for traditional communities in Brazil Northeast for different purposes; including treatment of several diseases and this study constitute safety information to human and animal use as well as future pharmacological studies to guarantee the safety of this plant species when used as a phytomedicine. The phytochemical profile associated to absence of toxic effects highlights the EES_{tb} promise to future pharmacological investigations.

RESUMO

Spondias tuberosa Arruda, popularmente conhecida como umbu, é uma espécie nativa da Caatinga amplamente utilizada na medicina popular, cujo perfil toxicológico ainda não é conhecido. Deste modo, este estudo avaliou o perfil fitoquímico, a toxicidade aguda e a citotoxicidade do extrato etanólico da casca da *Spondias tuberosa* Arruda (EES_{tb}) nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Foram utilizados ratos fêmeas Wistar (±210g) e divididos em: grupo controle

(C) e tratados com uma dose única de 300mg/Kg (EES_{tb₃₀₀}) ou 2.000mg/kg do peso corporal (EES_{tb₂₀₀₀}) do EES_{tb}. Após 24 horas e 14 dias da gavagem, os parâmetros comportamentais, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos foram determinados. O efeito citotóxico foi avaliado em células HEp-2. Não foi observada mortalidade ou alterações de massa corporal durante os 14 dias de experimento nos grupos EES_{tb₃₀₀} e EES_{tb₂₀₀₀}, mas EES_{tb₂₀₀₀} provocou uma redução discreta no consumo hídrico e alimentar, assim como na atividade locomotora no 1º dia de tratamento. Não houve alterações nos parâmetros histopatológicos, macroscópicos, bioquímicos e hematológicos. EES_{tb₃₀₀} nas concentrações de 6.25-50µg.mL⁻¹ não produziu efeito citotóxico na célula HEp-2. Estes resultados sugerem que EES_{tb} não promoveu toxicidade aguda ou citotóxica, sugerindo boa margem de segurança para uso da *Spondias tuberosa* Arruda.

Palavras-chave: Toxicidade aguda, citotoxicidade, fitomedicina, segurança, *Spondias arruda*, toxicologia.

ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Research fellowships) and Propesq/UFPE.

REFERENCES

- AGUILAR-BARAJAS E, SORK VL, GONZÁLEZ-ZAMORA A, ROCHA-RAMÍREZ V, ARROYO-RODRÍGUEZ V AND OYAMA K. 2014. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Spondias radlkoferi* (Anacardiaceae). *Appl Plant Sci* 3: 1-3.
- AHMAD M, LIM CP, AKOWUAH GA, ISMAIL NN, HASHIM MA, HOR SY, ANG LF AND YAM MF. 2013. Safety assessment of standardised methanol extract of *Cinnamomum burmannii*. *Phytomedicine* 15: 1124-1130.
- DA SILVA AR, DE MORAIS SM, MARQUES MM, DE OLIVEIRA DF, BARROS CC, DE ALMEIDA RR, VIEIRA IG AND GUEDES MI. 2012. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharm Biol* 50: 740-746.
- DE SOUSA ARAÚJO TA, ALENCAR NL, DE AMORIM EL AND DE ALBUQUERQUE UP. 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J Ethnopharmacol* 120: 72-80.
- DE SOUSA ARAÚJO TA, DE ALMEIDA E CASTRO VT, DE AMORIM EL AND ALBUQUERQUE UP. 2012. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. *Pharma Biol* 50: 754-759.
- DENG YX ET AL. 2013. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: acute and subacute toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol* 35: 240-246.
- FERNÁNDEZ SP, WASOWSKI C, LOSCALZO LM, GRANGER RE, JOHNSTON GA, PALADINI AC AND MARDER M. 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol* 539: 168-176.
- GARNER RJ. 1975. *Veterinary Toxicology*. London: Cassel and Collier Macmillan Publishers, 438 p.
- GAUTAM MK AND GOEL RK. 2014. Toxicological Study of *Ocimum sanctum* Linn Leaves: Hematological, Biochemical, and Histopathological Studies. *J Toxicol*, p. 1-9.
- GERAN RI, GREENBERG NH, MACDONALD MM, SCHUMACHER AM AND ABBOTT BJ. 1972. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems. *Cancer Chemother Rep* 3: 17-19.
- GOUTMAN JD, WAXEMBERG MD, DONATE-OLIVER F, POMATA PE AND CALVO DJ. 2003. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *Eur J Pharmacol* 461: 79-87.
- GRIEBEL G, PERRAULT G, TAN S, SCHOEMAKER H AND SANGER DJ. 1999. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. *Neuropharmacology* 38: 965-977.
- JÄGER AK AND SAABY L. 2011. Flavonoids and the CNS. *Molecules* 16: 1471-1485.
- LINS NETO EM, PERONI N AND DE ALBUQUERQUE UP. 2010. Traditional Knowledge and Management of Umbu (*Spondias tuberosa*, Anacardiaceae): An Endemic Species from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. *Econ Bot* 64: 11-21.
- LINS NETO EM, PERONI N, MARANHÃO CM, MACIEL MI AND DE ALBUQUERQUE UP. 2012. Analysis of umbu (*Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) in different landscape management regimes: a process of incipient domestication? *Environ Monit Assessm* 184: 4489-4499.
- LUKA J, BADAU SJ, MBAYA AW, GADZAMA JJ AND KUMSHE HA. 2014. Acute toxicity study and effect of prolonged administration (28 days) of crude ethanolic root extract of *Diospyros mespiliformis* (Ebenaceae) on clinical, haematological and biochemical parameters of albino rats. *J Ethnopharmacol* 15: 268-273.
- MELO MC, GADELHA DN, OLIVEIRA TK AND BRANDT CT. 2014. Alcohol extract of *Schinus molle* (Schubertia) as a local antimicrobial agent in severe autogenously fecal peritonitis in rats. *Acta Cir Bras* 29: 52-56.

- MILLER A AND SCHAAL B. 2005. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12801-12806.
- NORTIER JL AND VANHERWEGHEM JL. 2007. For patients taking herbal therapy - lessons from aristolochic acid nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 22: 1512-1517.
- OECD. 2001. "Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method." Test Guideline 423, 2001.
- OJEWOLE JA. 2005. Anti-inflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Magnifera indica* Linn (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 27: 547-554.
- OLSON H ET AL. 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: 56-57.
- PAN X, CHANG F, LIU Y, XU A, SHEN Y AND HUANG Z. 2009. Mouse toxicity of *Anabaena flos-aquae* from Lake Dianchi, China. *Environ Toxicol* 24: 10-18.
- REICHEN J AND PAUMGARTNER G. 1980. Excretory function of the liver. *Int Rev Physiol* 21: 103-150.
- SANTHOSH S, SINI TK, ANANDAN R AND MATHEW PT. 2007. Hepatoprotective activity of chitosan against isoniazid and rifampicin-induced toxicity in experimental rats. *Eur J Pharmacol* 15: 69-73.
- SINGLETON VL, ORTHOFER R AND LAMUELA-RAVENTÓS RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299: 152-178.
- TADJIMUKHAMEDOV FK, HUANG G, OUYANG Z AND COOKS RG. 2012. Rapid detection of urushiol allergens of *Toxicodendron* genus using leaf spray mass spectrometry. *Analyst* 137: 1082-1084.
- VIOLA H, WASOWSKI C, LEVI DE STEIN M, WOLFMAN C, SILVEIRA R, DAJAS F, MEDINA JH AND PALADINI AC. 1995. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med* 61: 213-216.
- WAGNER H AND BLADT S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed., Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 384 p.
- WOISKY RG AND SALATINO A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. *J Apicultural Research* 37: 99-105.
- ZIELINSKI AA, ÁVILA S, ITO V, NOGUEIRA A, WOSIACKI G AND HAMINIUK CW. 2014. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and *in vitro* antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. *J Food Sci* 79: 510-516.

ANEXO C - Parecer da comissão de ética no uso de animais



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 06 de junho de 2014.

Ofício nº 20/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Eduardo Carvalho Lira**

Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.016693/2014-88

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeito hipoglicemiante e hipolipemiante do extrato etanólico bruto de *Spondias tuberosa* Arruda em ratos diabéticos”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB/UFPE; Animais: ratos; Linhagem: *Wistar*; Sexo: machos; Peso: 180-200g; Número total de animais previsto no protocolo: 48.

Atenciosamente,

Prof.ª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

