

VIVIANA MILAGROS ALVARADO CARDENAS

**IDENTIFICAÇÃO DOS ATIVOS E O EFEITO DAS FRAÇÕES  
HIDROALCOÓLICA E ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE  
*Smalanthus sonchifolius* (yacón) SOBRE PARÂMETROS  
BIOQUÍMICOS EM RATOS WISTAR NORMAIS E COM DIABETES  
INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lys Mary Bileski Cândido  
Co-orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

**Curitiba  
2005**

Dedico esta dissertação à minha  
filha, hoje o motivo da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus e a minha mãe que está com Ele no céu.

Ao Cesar, pelo apoio, pela paciência e amor.

A minha mãe Ali e aos meus familiares, pelo apoio incondicionais.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lys Mary Bileski Cândido, pela orientação, paciência e dedicação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, pela orientação na parte fitoquímica do trabalho, pela amizade, os conselhos e as longas conversas (que pasa....!!!).

Ao Prof. Tit. Cid Ambiré de Moraes Santos, por me aceitar no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mayumi Eliza Otsuka Sato e a Prof<sup>a</sup>. Ma. Luiza Drescher, pela ajuda e amizade.

À Regina, pela ajuda e apoio ao longo do mestrado.

Aos Prof. Dr Luiz Cláudio Fernandes e Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka, pela orientação e ajuda na indução do diabetes nos ratos.

À Yerbalatina Phytoactives, por ter nos cedido as folhas e exsicata.

Ao Laboratório Champagnat, pelos análises bioquímicos.

Ao Dr.Gert Hatschbach, por herborizar as folhas.

À Maria da Graça T. Toledo, pela amizade e pela ajuda no uso do aparelho de HPLC.

Aos funcionários do Biotério da UFPR especialmente ao Cândido, pelo fornecimento dos ratos utilizados neste trabalho.

Ao Jair Lima e à Juliana Silveira, pela amizade e pela ajuda gigantesca nos experimentos com os ratos.

Aos professores do Laboratório da Fitoquímica e aos colegas, em especial ao João de Souza Carvalho, ao Jessé B. Lagos, pelos cromatogramas, à Elizabeth, ao Aurélio, à Suzane Virtuoso e à Aline Davet.

À Yeny e as amigas do pensionato Meigy, Lenisse e a Juliana pela amizade sincera.

## EPÍGRAFE

---

O rio atinge seus objetivos porque  
aprendeu a contornar obstáculos.

(Lao-Tsé)

# SUMÁRIO

---

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 DIABETES MELLITUS.....	4
2.1.1 Classificação.....	5
2.1.1.1 Diabetes tipo 1 ou Diabetes mellitus insulino dependente (DMID).....	5
2.1.1.2 Diabetes tipo 2 ou Diabetes mellitus não insulino dependente (DMNID).....	6
2.1.1.3 Outros tipos de diabetes.....	7
2.1.1.4 Diabetes gestacional.....	8
2.1.2 Etiologia.....	8
2.1.3 Dieta e exercício.....	9
2.1.4 Risco e complicações.....	11
2.1.5 Modelos de animais diabéticos.....	12
2.1.5.1 Drogas.....	12
2.1.5.2 Intervenção cirúrgica.....	13
2.1.5.3 Dietas.....	13
2.1.5.4 Métodos mistos.....	14
2.2 INSULINA.....	14
2.2.1 Ação insulínica.....	16
2.2.2 Etapas iniciais da sinalização insulínica.....	17
2.2.2.1 Receptor de insulina.....	17
2.2.2.2 Inibição da sinalização do receptor de insulina.....	18
2.2.2.3 A PI3-quinase e a proteína quinase B (PKB/Akt).....	19
2.2.2.4 A via CAP/Cbl.....	21
2.2.2.5 Cascatas de fosforilação estimuladas pela insulina.....	21
2.2.2.6 Regulação da síntese de glicogênio.....	22
2.3 YACÓN.....	24
2.3.1 Família Compositae.....	24
2.3.2 Gênero <i>Smallanthus</i> .....	24
2.3.2.1 Aspectos Morfológicos do Gênero.....	25
2.3.2.1.1 Aspectos Morfológicos da Espécie.....	28
2.3.2.2 Posição sistemática do <i>Smallanthus</i> .....	32
2.3.2.3 Aspectos agronômicos.....	33
2.3.2.3.1 Propagação.....	33
2.3.2.3.2 Semeadura.....	33
2.3.2.3.3 Crescimento e desenvolvimento.....	33
2.3.2.3.4 Colheita das folhas.....	34
2.3.2.3.5 Rendimento de folhas.....	34

2.3.2.4	Aspectos quimiotaxonômicos.....	35
2.3.2.5	Aspectos fitoquímicos.....	37
2.3.2.6	Aspectos Biológicos e Farmacológicos.....	39
2.3.2.6.1	Atividade antimicrobiana.....	40
2.3.2.6.2	Mecanismo de ação “tipo insulina”.....	41
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	MATERIA PRIMA.....	42
3.1.1	Material botânico.....	42
3.1.2	Animais.....	42
3.2	METODOLOGIA.....	43
3.2.1	Estudos Fitoquímicos.....	43
3.2.1.1	Processo de secagem das folhas.....	43
3.2.1.2	Obtenção das frações hidroalcoólico (HA, clorofórmica, e acetato de etila.....	43
3.2.1.3	Determinação do Teor de Sólidos das Frações.....	45
3.2.1.4	Identificação dos ativos presentes nas frações hidroalcoólica e acetato de etila.....	45
3.2.1.4.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) para visualização de fenólicos.....	46
3.2.1.4.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	46
3.2.1.4.3	Dosagem de compostos fenólicos totais por espectrofotometria.....	47
3.2.2	Estudo Farmacológico.....	48
3.2.2.1	Obtenção das doses das frações hidroalcoólica e acetato de etila.....	48
3.2.2.2	Ensaio preliminar para a eleição da via de administração das frações... ..	49
3.2.2.3	Indução do diabetes.....	49
3.2.2.4	Organização dos grupos animais.....	50
3.2.2.5	Dosagem da glicemia.....	51
3.2.2.6	Determinação da glicosúria.....	51
3.2.2.7	Determinação do peso dos ratos.....	51
3.2.2.8	Administração das frações.....	52
3.2.2.9	Determinação da síntese de glicogênio.....	52
3.2.2.10	Quantificação de parâmetros bioquímicos.....	54
3.2.3	Análise Estatística.....	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1	ESTUDOS FITOQUÍMICOS.....	55
4.1.1	Determinação do teor de sólidos das frações.....	55
4.1.2	Análises realizadas por CCD para fenólicos.....	55
4.1.3	Análises realizadas por CLAE para fenólicos.....	56
4.1.4	Dosagem para compostos fenólicos por espectrofotometria.....	62
4.2	ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	63
4.2.1	Eleição da via de administração.....	63
4.2.2	Dosagem da glicemia.....	64
4.2.3	Determinação da glicose na urina dos ratos.....	66
4.2.4	Dosagem de glicogênio.....	67
4.2.5	Quantificação dos parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos.....	69
	CONCLUSÕES.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1	– POSIÇÃO SISTEMÁTICA: SEGUNDO O SISTEMA PROPOSTO POR CRONQUIST.....	32
TABELA 2	– POSIÇÃO SISTEMÁTICA: SEGUNDO O SISTEMA PROPOSTO POR ENGLER.....	32
TABELA 3	– VARIÁVEIS DE PRODUÇÃO DE FOLHA EM 3 MORFOTIPOS DE YACÓN DA COLEÇÃO DE GERMOPLASMA.....	35
TABELA 4	– CONTEÚDO DE CARBÓIDRATOS.....	36
TABELA 5	– ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS.....	50
TABELA 6	– RESULTADO DA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Smallanthus sonchifolius</i> (yacón).....	55
TABELA 7	– CONCENTRAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM FRAÇÕES DE FOLHAS DE YACÓN .....	62
TABELA 8	– RESULTADOS DA VARIAÇÃO DA DOSAGEM DE GLICEMIA EM RATOS NORMAIS, COM TRATAMENTOS E COM DIABETES INDUZIDA POR STZ.....	65
TABELA 9	– RESULTADOS DA VARIAÇÃO DA DOSAGEM DE GLICOSÚRIA.....	66
TABELA 10	– RESULTADOS DA VARIAÇÃO DA DOSAGEM DE GLICOGÊNIO NOS TECIDOS GASTROCNÊMIO, SÓLEO E FIGADO.....	68
TABELA 11	– RESULTADOS DA VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES.....	69
TABELA 12	– PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE INDUÇÃO DE DIABETES.....	70
TABELA 13	– COMPONENTES BIOQUÍMICOS DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	70

## LISTA DE FIGURAS

---

FIGURA 1 – VIAS DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA.....	18
FIGURA 2 – REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE GLICOSE NO FÍGADO.....	23
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA <i>Smallanthus sonchifolius</i> (yacón).....	27
FIGURA 4 – DETALHES DA PLANTA DE <i>Smallanthus sonchifolius</i> (yacón).....	29
FIGURA 5 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA ESPÉCIE <i>Smallanthus sonchifolius</i> (yacón).....	30
FIGURA 6 – PRINCIPAIS FORMAS DE LÂMINAS DAS FOLHAS E DA PÊTALA NA FLOR FEMININA DE YACÓN.....	31
FIGURA 7 – DERIVADOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES DAS FOLHAS DE YACÓN.....	38
FIGURA 8 – MELAMPÓLIDES DAS FOLHAS DE YACÓN.....	39
FIGURA 9 – DIAGRAMA DE FLUXO DE PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DE YACÓN.....	44
FIGURA 10 – FOTOS DO EXTRATOR DE SOXHLET UTILIZADO NA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	45
FIGURA 11 – INDUÇÃO DE DIABETES.....	49
FIGURA 12 – ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS.....	50
FIGURA 13 – DOSAGEM DA GLICEMIA.....	51
FIGURA 14 – ADMINISTRAÇÃO DAS FRAÇÕES.....	52
FIGURA 15 – OBTENÇÃO DOS MUSCULOS SÓLEO, GASTROCNÊMIO E DO FÍGADO.....	53
FIGURA 16 – OBTENÇÃO DO SANGUE POR PUNÇÃO CARDIACA.....	54
FIGURA 17 – CCD ILUSTRATIVA DA COMPARAÇÃO DOS PADRÕES COM AS FRAÇÕES HIDROALCOÓLICO E ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE YACÓN.....	56
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA EM CLAE DOS PADRÕES.....	57
FIGURA 19 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA DAS FOLHAS DE <i>S. sonchifolius</i> .....	58
FIGURA 20 – CROMATOGRAMA EM CLAE DO PADRÃO DE ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO.....	59
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA EM CLAE DO PADRÃO DE ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO E A FRAÇÃO HIDROALCOÓLICAS DAS FOLHAS DE <i>S. sonchifolius</i> .....	60
FIGURA 22 – CROMATOGRAMA EM CLAE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>S. sonchifolius</i> .....	61
FIGURA 23 – ADMINISTRAÇÃO VIA ORAL.....	63
FIGURA 24 – ADMINISTRAÇÃO VIA INTRA PERITONEAL.....	64
FIGURA 25 – RESULTADO DA DOSAGEM DE GLICEMIA.....	65
FIGURA 26 – DETERMINAÇÃO DA GLICOSÚRIA.....	67
FIGURA 27 – RESULTADO DA DOSAGEM DE GLICOGÊNIO.....	68
FIGURA 28 – QUANTIFICAÇÃO DE COLESTEROL.....	72
FIGURA 29 – QUANTIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS.....	73
FIGURA 30 – QUANTIFICAÇÃO DA URÉIA.....	74

FIGURA 31 – QUANTIFICAÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA.....	75
FIGURA 32 – QUANTIFICAÇÃO DE TGP.....	76
FIGURA 33 – QUANTIFICAÇÃO DE TGO.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

µg	Micrograma
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius
Ac	Anticorpos
AcOEt	Acetato de etila
AE	Fração acetato de etila
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Fração acetato de etila
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
g	Grama
GLUT-4	Transportador de Glicose-4
GRB2	Growth factor receptor bound protein 2
HA	Fração hidroalcoólica
HE	Frações hexânicas
h	Hora
ha	Hectare
HLA	Antigenos de histocompatibilidade
IRS	Substrato para receptor de insulina
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
ME	Extrato metanólico
MEK	MAPK/Erk quinase
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
PF	Peso fresco
PI3K	Fosfoinosítido 3 quinase
PKC	Proteína quinase C

RE	Retículo endoplasmático
SOS	Son of sevenless guanine nucleotide exchange factor
STZ	Streptozotocina
t	Tempo
YES	Meio yeast extract sucrose
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima

## RESUMO

---

O objetivo do presente trabalho foi a obtenção das frações hidroalcoólica e acetato de etila de folhas de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (yacon), e a avaliação do efeito anti hiperglicemiante das frações em ratos normais e com diabetes induzido por estreptozotocina. Para a obtenção das frações, foram desenvolvidas tecnologias extrativas de fracionamento por processo tradicional em Soxhlet analítico modificado. Obtidas as frações hidroalcoólica e acetato de etila procedeu-se ao ensaio farmacológico. Quarenta cinco ratos machos Wistar foram distribuídos em 6 grupos; 3 grupos com 10 ratos cada e 3 grupos com 5 ratos cada: GRUPO CONTROLE: animais sem tratamento (5 animais), GRUPO DIABETES: inoculação endovenosa (veia peniana) de estreptozotocina na dose de 60mg/kg (10 animais), GRUPO DIABETES – FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA: administração oral da fração hidroalcoólica na dose de 28,5 mg/kg/dia em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (10 animais), GRUPO FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA: administração oral da fração hidroalcoólica na dose de 28,5 mg/kg/dia em ratos normais (5 animais), GRUPO DIABETES – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA: administração oral da fração acetato de etila na dose de 3,2 mg/kg/dia em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (10 animais), GRUPO FRAÇÃO ACETATO DE ETILA: administração oral da fração acetato de etila na dose de 3,2 mg/kg/dia em ratos normais (5 animais). Foram realizados testes de glicemia e glicosúria em todos os grupos cada sete dias. Depois de quarenta dias de experimentação os ratos foram sacrificados e por punção cardíaca foram tirados 2 mL de sangue para a posterior quantificação dos parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, TGP e TGO). Uma vez obtidos os resultados das análises observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $P>0,05$ ) entre os ratos diabeticos que receberam as frações hidroalcoólica e acetato de etila com os ratos diabeticos sem tratamento, mas houve uma diferença

expressiva entre os ratos diabéticos que receberam a fração hidroalcoólica e os ratos diabéticos sem tratamento. De acordo com a análise fitoquímica verificou-se a presença de compostos fenólicos simples (ácido cafeico, ferúlico e clorogênico) e flavonóides como quercetina, *o*-metil quercetina, rutina, luteolina-7-G, luteolina e ácido *p*-cumárico. Com esses resultados concluímos que o diabetes que foi induzido foi um diabetes tipo I, que a fração hidroalcoólica tem um efeito anti hiperglicemiante mas não regula os parâmetros bioquímicos como é mencionado na literatura e finalmente o efeito anti hiperglicemiante das frações das folhas de yacón poderia ser atribuída ao efeito antioxidante e hepatoprotetor dos compostos fenólicos.

## ABSTRACT

---

The objective of the present work was the attainment of hidroalcoholic and ethyl acetate fractions of the leaves of *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (yacon), and the evaluation of the hypoglycemic effect of the fractions in normal and estreptozotocin-induced diabetic rats. For the attainment of fractions, was developed extractive technologies of partition by traditional process in modified analytic Soxhlet. Obtained the hidroalcoholic and acethyl acetate fractions was used the pharmacological assay. Forty five male Wistar rats had been distributed in 6 groups; 3 groups with 10 rats each and 3 groups with 5 rats each, CONTROL GROUP: animals without treatment (5 animals), DIABETIC GROUP: intravenous administration (peniane vein) of streptozotocin in the dose of 60mg/kg (10 animals), DIABETIC-HIDROALCOHOLIC FRACTION GROUP: oral administration of hidroalcoholic fraction in streptozotocin-induced diabetic rats in the dose of 28,5 mg/kg (10 animals), HIDROALCOHOLIC FRACTION GROUP: oral administration of hidroalcoholic fraction in normal rats in the dose of 28,5 mg/kg (5 animals), DIABETIC-ETHYL ACETATE FRACTION GROUP: oral administration of ethyl acetate fraction in streptozotocin-induced diabetic rats in the dose of 3,2 mg/kg (10 animals), ETHYL ACETATE FRACTION GROUP: oral administration of ethyl acetate fraction in normal rats in the dose of 3,2 mg/kg (5 animals). After forty days of experimentation the rats were sacrificed and the blood (2 mL) was removed by cardiac puncture for the subsequent quantification of the biochemical parameters (glucose, cholesterol, urea, creatinine, alkaline fosfatase, GPT and GOT). The results of the analyses indicate that there was not significant statistic diference ( $P>0,05$ ) between diabetic rats that received the hidroalcoholic and ethyl acetate fractions with the diabetic rats without treatment, but there was an expressive diference between diabetic rats that received the hidroalcoholic fraction and the diabetic rats without

treatment. In agreement with the phytochemistry analysis the presence of the phenolic compounds was verified (cafeic acid, ferulic acid and chlorogenic acid) and flavonóides as quercetin, *o*-methyl quercetin, rutin, luteolin-7-G, luteolin and *p*-cumaric acid. We concluded that the diabetes induced was diabetes type I; the hidroalcoholic fraction has an effect anti hiperglicemic were but it doesn't regulate the biochemical parameters as was mentioned in previous literature finally the effect anti hiperglicemic of the yacon's fractions could be attributed to the antioxidant and hepatoprotector effect of the phenolic compounds.