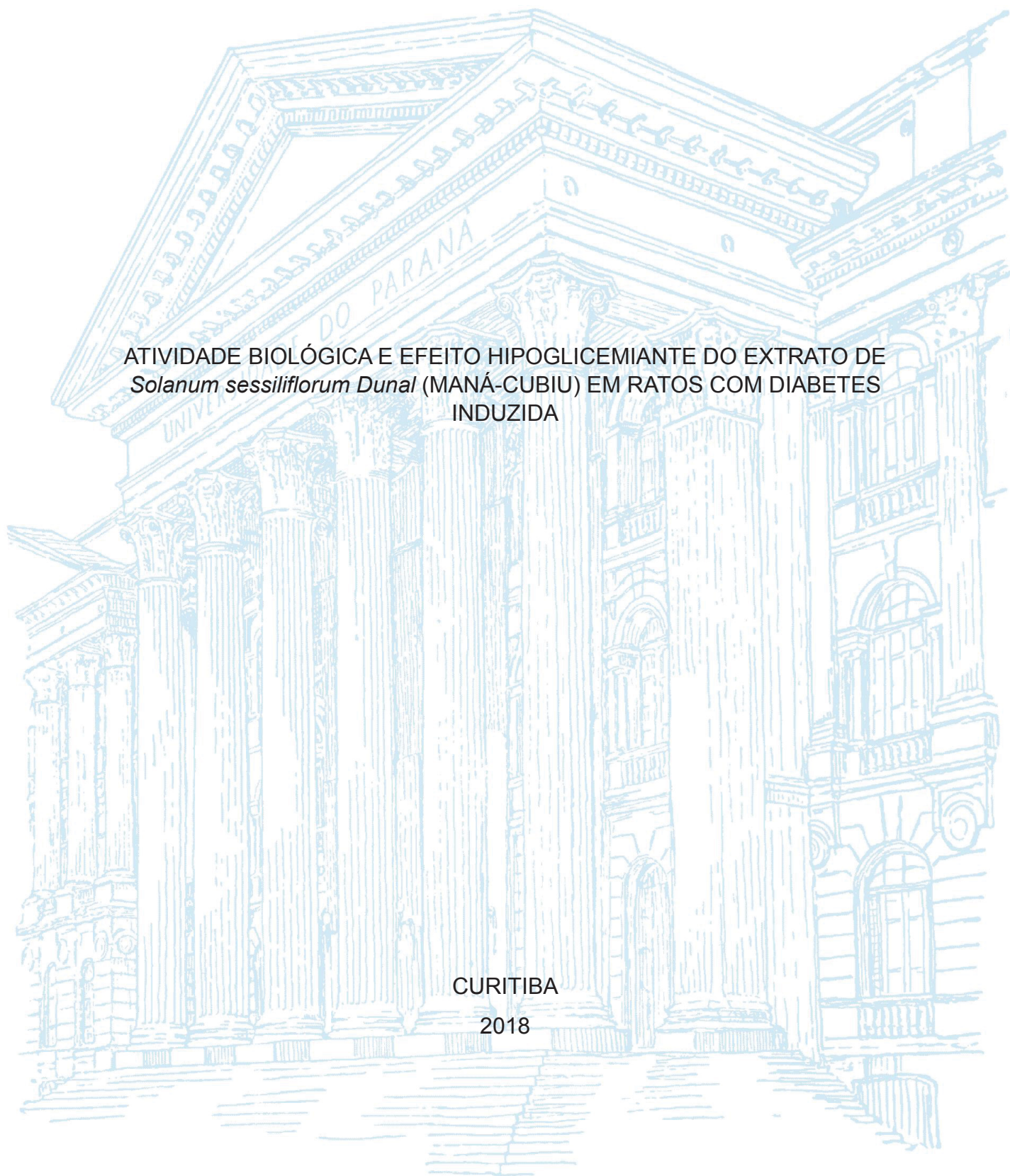


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA TALAMINI PILTZ

ATIVIDADE BIOLÓGICA E EFEITO HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO DE  
*Solanum sessiliflorum* Dunal (MANÁ-CUBIU) EM RATOS COM DIABETES  
INDUZIDA

CURITIBA  
2018



MARINA TALAMINI PILTZ

ATIVIDADE BIOLÓGICA E EFEITO HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATO DE  
*Solanum sessiliflorum Dunal* (MANÁ-CUBIU) EM RATOS COM DIABETES  
INDUZIDA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Alimentação e Nutrição.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Cláudia Carneiro Hecke Kruguer  
Coorientador(a): Prof(a). Dr(a). Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2018

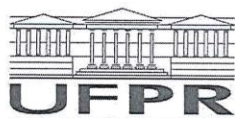
Piltz, Marina Talamini

Atividade biológica e efeito hipoglicemiante do extrato de *solanumsessiliflorum dunal* (maná-cubiu) em ratos com diabetes induzida [recurso eletrônico] / Marina Talamini Piltz – Curitiba, 2018.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.  
Orientador: Dr<sup>a</sup>. Cláudia Carneiro Hecke Krüger

1. *Solanumsessiliflorum*Dunal. 2. Hipoglicemiantes. 3. Diabetes Mellitus. I. Krüger, Cláudia Carneiro Hecke. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.32



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ALIMENTAÇÃO E  
NUTRIÇÃO

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARINA TALAMINI PILTZ** intitulada: **Atividade biológica e efeito hipoglicemiante do extrato de *Solanum sessiliflorum* Dunal (maná-cubiu) em ratos com diabetes induzida**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Julho de 2018.

CLAUDIA CARNEIRO HECKE KRUGER  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

THAIS ANDRADE COSTA CASAGRANDE  
Avaliador Externo (UP)

JANAÍNA MENEZES ZANOVELI  
Avaliador Externo (UFPR)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me permitir viver esta experiência intensa que foi o mestrado. Por me fortalecer com sabedoria e coragem e por guiar meu caminho, sempre.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe e meu marido, pelo incentivo e apoio constantes. Obrigada pela ajuda direta, indo comigo ao laboratório aos finais de semana para tratar os animais e à Antonina, para buscar os frutos, meu principal objeto de estudo. E indiretamente, pelas horas de distração, pelos conselhos nos momentos difíceis, que não foram poucos!

Ao meu pai, pelo exemplo que sempre me deu ao longo da vida, que mesmo presente em memória, me fez ter a motivação necessária para seguir adiante e enfrentar os desafios que surgiram. O início desta caminhada marcou a nossa despedida nesta vida e por isso, à ele dedico estes dois anos de trabalho.

Minha gratidão à minha orientadora, professora Claudia Kruguer, por desempenhar esta função tão bem e ir além, se tornando um exemplo profissional e pessoal para mim. Admiro principalmente, sua calma e otimismo em conduzir cada uma das etapas deste estudo. Além da confiança em mim depositada para assumir as tarefas e oportunidades que tive a honra de trilhar.

Sou grata também à professora Deise Montriuccho, minha coorientadora, que tive a oportunidade de conhecer neste trabalho e com quem aprendi muito, com sua experiência em algo tão novo para mim. Sua colaboração foi muito grande para que esta área, até então desconhecida, passasse a ser de grande afinidade.

Assim como aos demais professores que contribuíram com sugestões, conhecimento e empréstimo de seus laboratórios. Professor Obdúlio Gomes Miguel, Aline Hauser, Sila Mary Ferreira, Maria da Graça, Karina Bette Christiane Queiroz, Lucélia Donatti e Sérgio Ioshii. MUITO OBRIGADA!

Aos técnicos do departamento de nutrição: Jair, Luiz, Lindamir e Adriana; técnicos do departamento de farmácia: Aline, Paulo e Maurício; Alunas de iniciação científica: Vitória, Maria Luíza e Anna Flávia; e Pós-doutorando Marco, que dispuseram de seu tempo e dedicação para contribuir com as análises realizadas.

Às colegas de turma e de disciplinas, que dividiram anseios, angústias e momentos de descontração ao longo desses dois anos, muito obrigada por se mostrarem tão presentes, inclusive em momentos adversos.

Às alunas da disciplina de Nutrição Experimental, na qual tive minha primeira experiência como docente. Obrigada pela paciência e dedicação ao longo da disciplina, vocês foram uma turma exemplar e tornaram tão prazerosa essa etapa.

Aos alunos do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelas parcerias em diversas análises. Aos doutorandos Mirna, Francis, Luciana e Aiane pela grande ajuda na rotina de laboratório e nos experimentos com os animais. Sem vocês não teria sido possível.

Aos membros da banca examinadora, Professoras Janaína Zanoveli e Thais Costa, obrigada pelo aceite em contribuir com a avaliação deste trabalho, por enriquecê-lo com toda experiência que possuem.

Ao biotério da Universidade Federal do Paraná, pelos animais fornecidos. Ao PROAP, CAPES e coordenação do PPGAN pelos recursos que viabilizaram este estudo.

“As nuvens sempre passam.  
Podem ser nuvens claras ou escuras, mas sempre passam.  
Talvez tenha que chover uma tempestade, mas ela também passa.  
Compreenda que você não é a nuvem, você é o céu.”

Sri Prem Baba

## RESUMO

O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um fruto de sabor exótico, proveniente da sociobiodiversidade da Região Amazônica, é como alimento, na produção de medicamentos e cosméticos. Popularmente, o fruto também é consumido com o intuito de reduzir os níveis séricos de colesterol, ácido úrico e glicemia, objetivando o controle da diabetes. Diabetes Mellitus é uma doença caracterizada por uma desordem metabólica, conhecida pela elevação da glicose sérica e acomete milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que até o ano de 2030, 439 milhões de pessoas terão a doença. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, toxicidade preliminar e efeito hipoglicemiante do maná-cubiu. Os frutos foram adquiridos na Associação dos Pequenos Produtores Rurais de Antonina –PR (ASPRAN), no município de Antonina, no litoral do estado do Paraná, Brasil. Foram realizadas análises de determinação de comprimento, diâmetro, peso, classificação segundo estádios de maturação, rendimento das partes do fruto e caracterização físico química. Para determinação de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante, toxicidade preliminar e administração do fruto para os animais no ensaio *in vivo*, foi obtido o extrato etanólico do fruto. Foram utilizados 36 animais induzidos ao diabetes pela injeção intraperitoneal de estreptozotocina na dose de 50 mg/kg, com exceção do grupo controle. Os extratos foram administrados via gavagem nas doses de 100mg/kg, 200mg/kg do fruto inteiro, 100mg/kg da polpa e 20 mg/kg da casca do fruto, durante 28 dias. Os resultados obtidos indicaram que o maná-cubiu possui sementes com os maiores teores de proteínas (1,09g/100g  $\pm$  0,37) e lipídios (2,59g/100g  $\pm$  0,47) do fruto e a casca apresentou elevada atividade antioxidante, com maiores concentrações de compostos fenólicos totais (412,36mg/ml  $\pm$  61,6) e flavonoides (99,69 $\mu$ g de quercetina/100ml  $\pm$  11,35) do que a polpa. Os ensaios de toxicidade preliminar indicaram que as frações do fruto não apresentam toxicidade (<1000 $\mu$ g/ml), podendo ser consumidos por animais e também incluídos na dieta de populações. Nos resultados obtidos nas análises histopatológicas, o maná-cubiu mostrou boa ação protetora dos tecidos renal, hepático e pancreático em relação aos danos gerados pelo diabetes induzido. Os ratos que receberam os extratos do fruto apresentaram comportamento menos ansioso que o controle diabético no teste de campo aberto. Na etapa piloto do estudo, realizada com 18 animais, verificou-se também a redução significativa nos valores de hemoglobina glicada dos animais tratados com o extrato da casca do fruto na etapa piloto do experimento. A experimentação animal com modelos diabéticos permitiu avaliar aspectos ainda não muito explorados pela literatura sobre o fruto, permitindo o aprimoramento para novas pesquisas sobre o maná-cubiu.

Palavras-chave: *Solanum*; *Solanum sessiliflorum* Dunal; cocona; maná-cubiu; efeito hipoglicemiante; atividade antioxidante



## ABSTRACT

Maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) is a fruit with exotic flavor, coming from the socio-biodiversity of the Amazon Region, it is like food, in the production of medicines and cosmetics. Popularly, the fruit is also consumed with the intention of reducing serum levels of cholesterol, uric acid and glycemia, aiming to control diabetes. Diabetes Mellitus is a disease characterized by a metabolic disorder, known for elevated serum glucose and affects millions of people around the world. It is estimated that by the year 2030, 439 million people will have the disease. Thus, this study had as objective to evaluate the antioxidant activity, preliminary toxicity and hypoglycemic effect of mana-cubiu. The fruits were purchased from the Antonina -PR (ASPRAN) Small Farmers Association, in the municipality of Antonina, on the coast of the state of Paraná, Brazil. Analysis of length, diameter, weight, classification according to maturation stages, yield of fruit parts and chemical physical characterization were performed. For the determination of phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, preliminary toxicity and administration of the fruit to the animals in the in vivo test, the ethanolic extract of the fruit was obtained. Thirty-six rats were induced to diabetes by intraperitoneal injection of streptozotocin at 50 mg / kg, except for the control group. The extracts were administered via gavage at doses of 100mg / kg, 200mg / kg of the whole fruit, 100mg / kg of the pulp and 20mg / kg of the fruit peel, for 28 days. The results showed that maná-cubiu has seeds with the highest protein (1.09g / 100g  $\pm$  0.37) and lipids (2.59g / 100g  $\pm$  0.47) contents of the fruit and the peel showed high antioxidant activity, with higher concentrations of total phenolic (412.36mg / ml  $\pm$  61.6) and flavonoids (99.69 $\mu$ g quercetin / 100ml  $\pm$  11.35) compounds than the pulp. Preliminary toxicity tests indicated that fruit fractions had no toxicity (<1000 $\mu$ g / ml) and could be consumed by animals and also included in the diet of populations. In the results obtained in the histopathological analyzes, maná-cubiu showed good protective action of the renal, hepatic and pancreatic tissues compared to the damages generated by the induced diabetes. The rats that received the extracts of the fruit presented less anxious behavior than the diabetic control in the open field test. There was also a significant reduction in the glycated hemoglobin values of the animals treated with the fruit peel extract in the pilot stage of the experimente, performed with 18 animals. The animal experimentation with diabetic models allowed to evaluate aspects not yet explored by the literature, allowing the improvement for new research about maná-cubiu.

Keywords: *Solanum*; *Solanum sessiliflorum* Dunal; cocona; mana-cubiu; hypoglycemic effect; antioxidant activity

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MANÁ-CUBIU PRODUZIDO EM ANTONINA –PR.....	<u>19</u>
FIGURA 2 – REGIÃO DE CULTIVO DO MANÁ-CUBIU NO ESTADO DO PARANÁ.....	<u>20</u>
FIGURA 3 – DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	<u>31</u>
FIGURA 4 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO <i>in vivo</i> .....	<u>40</u>
FIGURA 5 – ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DO MANÁ-CUBIU.....	<u>47</u>
FIGURA 6 – HEMOGLOBINA GLICADA E GLICOSE MÉDIA ESTIMADA NO ESTUDO PILOTO .....	<u>62</u>
FIGURA 7 – ANÁLISE HITOPATOLÓGICA DO FÍGADO EM COLORAÇÃO HE .....	<u>74</u>
FIGURA 8 – ANÁLISE HITOPATOLÓGICA DO RIM EM COLORAÇÃO HE .....	<u>76</u>
FIGURA 9 – ANÁLISE HITOPATOLÓGICA DO PÂNCREAS EM COLORAÇÃO HE .....	<u>79</u>
FIGURA 10 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO NO ESTUDO PILOTO .....	<u>80</u>
FIGURA 11 – TESTE DO CAMPO ABERTO NO ESTUDO PILOTO.....	<u>81</u>
FIGURA 12 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO.....	<u>82</u>
FIGURA 13 – TESTE DO CAMPO ABERTO.....	<u>83</u>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DIMENSIONAMENTO DA AMOSTRA .....	<u>45</u>
TABELA 2 - INTENSIDADE DE OCORRÊNCIA DE DEFEITOS .....	<u>46</u>
TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MANÁ-CUBIU .....	<u>48</u>
TABELA 4 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE MANÁ-CUBIU PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EXPRESSOS PELA CONCENTRAÇÃO EFETIVA EM 50% (CE50).....	<u>50</u>
TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	<u>53</u>
TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS .....	<u>54</u>
TABELA 7- TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO MANÁ-CUBIU .....	<u>55</u>
TABELA 8- CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR ABTS E DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS .....	<u>55</u>
TABELA 9 – TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS DO MANÁ-CUBIU.....	<u>56</u>
TABELA 10 – ENSAIO DE MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> e DL <sub>50</sub> .....	<u>57</u>
TABELA 11 – PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS DO ESTUDO PILOTO.....	<u>59</u>
TABELA 12 – MONITORAMENTO DO PESO SEMANAL DO ESTUDO PILOTO.....	<u>60</u>
TABELA 13 – MONITORAMENTO DA GLICEMIA CAPILAR DO ESTUDO PILOTO .....	<u>60</u>
TABELA 14 – EXAMES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS À GLICEMIA DO ESTUDO PILOTO .....	<u>61</u>
TABELA 15 – EXAMES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO PERFIL LIPÍDICO DO ESTUDO PILOTO.....	<u>63</u>
TABELA 16 – EXAMES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA DO ESTUDO PILOTO .....	<u>64</u>
TABELA 17 – PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS.....	<u>65</u>
TABELA 18 – MONITORAMENTO DO PESO SEMANAL.....	<u>67</u>

TABELA 19 – MONITORAMENTO DA GLICEMIA CAPILAR .....	<u>67</u>
TABELA 20 – CURVA GLICÊMICA.....	<u>68</u>
TABELA 21 – CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO.....	<u>69</u>
TABELA 22 – EXAMES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS À GLICEMIA .....	<u>70</u>
TABELA 23 – EXAMES BIOQUÍMICOS DO PERFIL LIPÍDICO .....	<u>71</u>
TABELA 24 – EXAMES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA .....	<u>72</u>
TABELA 25 – ANÁLISE HISTOPATOLOLÓGICA DO FÍGADO .....	<u>73</u>
TABELA 26 – ANÁLISE HISTOPATOLOLÓGICA DO RIM .....	<u>76</u>
TABELA 27 – ANÁLISE HISTOPATOLOLÓGICA DO PÂNCREAS .....	<u>78</u>

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – RENDIMENTO POR PARTES DO FRUTO IN NATURA SEGUNDO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO .....	<u>47</u>
GRÁFICO 2 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH DOS PADRÕES VITAMINA C E RUTINA .....	<u>51</u>
GRÁFICO 3 – CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE MANÁ-CUBIU DA CASCA E POLPA .....	<u>52</u>
GRÁFICO 4 – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS .....	<u>55</u>
GRÁFICO 5 – CURVA PADRÃO DE QUERCETINA PARA DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES .....	<u>56</u>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Objetivos .....	17
1.1.1 Objetivo geral .....	17
1.1.2 Objetivo específico .....	18
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>19</b>
2.1 Revisão de literatura.....	19
2.1.1 Características do fruto e da sociobiodiversidade brasileira.....	19
2.1.2 Atividades biológicas do maná-cubiu.....	23
2.1.3 Efeito hipoglicemiante e hipolipemiante do maná-cubiu .....	25
2.1.4 Experimentação animal .....	27
2.2 Material e métodos .....	30
2.2.1 Material.....	30
2.2.2 Métodos.....	30
2.2.2.1 Caracterização dos frutos.....	30
2.2.2.2 Caracterização físico-química .....	33
2.2.2.3 Obtenção dos extratos .....	33
2.2.2.4 Atividade antioxidante.....	33
2.2.2.5 Análise de toxicidade preliminar .....	37
2.2.2.6 Efeito hipoglicemiante <i>in vivo</i> .....	38
2.2.2.7 Testes de comportamento animal.....	43
2.2.2.8 Análise estatística.....	44

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b><u>45</u></b>
3.1 Caracterização da amostra .....	<u>45</u>
3.2 Intensidade de ocorrência de defeitos .....	<u>45</u>
3.3 Rendimento .....	<u>46</u>
3.4 Caracterização físico-química .....	<u>48</u>
3.5 Atividade antioxidante .....	<u>49</u>
3.6 Toxicidade preliminar .....	<u>57</u>
3.7 Efeito hipoglicemiante <i>in vivo</i> .....	<u>58</u>
3.7.1 Estudo piloto .....	<u>58</u>
3.7.2 Experimento .....	<u>64</u>
3.8 Testes de comportamento .....	<u>80</u>
3.8.1 Testes de comportamento do estudo piloto .....	<u>80</u>
3.8.2 Testes de comportamento do experimento .....	<u>82</u>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b><u>85</u></b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b><u>86</u></b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b><u>93</u></b>

## 1. INTRODUÇÃO

O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um fruto com sabor exótico, também conhecido popularmente como cocona, cubiu ou Kubi'u, em tupi (OLIVEIRA, 1999). Proveniente da sociobiodiversidade da Região Amazônica, é utilizado pelos nativos e habitantes desta região como alimento, medicamento e também como cosmético para dar brilho aos cabelos. Na alimentação, o fruto é utilizado principalmente na preparação de geleias, compotas, massas, conservas e doces (SERNA-COCK, 2015). Como medicamento, tem sido popularmente utilizado, ao longo dos anos, no controle de doenças e sintomas como prurido na pele, redução dos níveis de colesterol, ácido úrico e glicose sérica, objetivando o controle do diabetes, porém sem que haja ainda a comprovação científica para estes aspectos (YUYAMA et al, 2005). Esta possível atividade farmacológica do maná-cubiu poderia estar relacionada aos compostos bioativos do fruto, os quais desempenham atividade antioxidante, atuando inclusive na redução do estresse oxidativo (CERQUEIRA et al., 2007).

Estudos que avaliam a relação entre a dieta e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) têm sido explorados extensivamente ao longo de anos através da experimentação animal. Grande parte das intervenções realizadas neste tipo de pesquisa são destinadas a reduzir o risco de doenças ou seus sintomas. Ou ainda, caso estas hipóteses não sejam possíveis, a experimentação animal permite ao menos a observação do impacto sobre os biomarcadores da doença. Esta contribuição, permite por exemplo, a compreensão dos aspectos nutricionais ao longo dos últimos dois séculos (LOVEGROVE et al., 2015). No caso do diabetes, a indução em ratos é mais frequentemente realizada pela injeção de estreptozotocina, droga que causa morte de células beta-pancreáticas pela alquilação do seu DNA, permitindo assim, a obtenção de um modelo diabético utilizado na realização de experimentos sobre o tema (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016).

O Diabetes Mellitus é caracterizada por uma desordem metabólica, conhecida pela elevação da glicose sérica e acomete milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que até o ano de 2030, 439 milhões de pessoas terão a doença. O seu tratamento e controle podem ser feitos pelo controle da ingestão de carboidratos,



aumento do consumo de fibras e com a utilização de fármacos hipoglicemiantes. O tratamento farmacológico é a forma mais comum de controle glicêmico, porém este também é o método de tratamento que mais apresenta efeitos colaterais, como por exemplo: aumento do apetite, ganho de peso, maior risco de doenças cardiovasculares, distúrbios gastrointestinais, dores abdominais, diarreia e hepatotoxicidade (GONDI; RAO, 2015; BOLAND, EDELMAN; WOLOSIN, 2013).

Portanto, a realização do presente trabalho, justifica-se pela possibilidade de oferta de novos métodos de controle do diabetes, priorizando a qualidade de vida dos pacientes portadores desta desordem em minimizar ou evitar a presença de efeitos colaterais e demais malefícios do uso prolongado de drogas farmacológicas. Além disso, a utilização de frutos da sociobiodiversidade tem a finalidade de contribuição para segurança alimentar e nutricional da população que sobrevive e alimenta-se desses cultivos. Conforme observado pela FAO (2005), na Convenção sobre a Conferência de Diversidade Biológica sobre a relação entre biodiversidade, alimentação e nutrição, foi exposta a necessidade de fomentar a utilização sustentável da biodiversidade. Acerca deste conceito, outro importante aspecto é a inutilização das sementes e cascas, que são resíduos resultantes desses processos artesanais de produção dos subprodutos elaborados pela população produtora do fruto, sendo, portanto dispensados e inexplorados. O que também ocorre, em maior escala, com resíduos de outros frutos da agroindústria (SERNA-COCK, 2015).

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Realizar caracterização físico-química e identificar efeitos biológicos do maná-cubiu.

### 1.1.2. Objetivos específicos

- Realizar caracterização físico-química do maná-cubiu;
- Determinar atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir do maná-cubiu;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonóides dos extratos;
- Avaliar toxicidade preliminar dos extratos;
- Avaliar o potencial hipoglicemiante e *in vivo*;
- Avaliar o comportamento animal dos animais tratados com o extrato do fruto.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1.1. Características do fruto e da sociobiodiversidade brasileira

O maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) é um fruto nativo da Amazônia brasileira, peruana e colombiana (FIGURA 1) (YUYAMA, 2007) e passou a ser cultivado pelos povos indígenas da região antes da chegada dos europeus (SILVA FILHO et al., 2005). Além dos benefícios alimentares e de recurso natural, o fruto também se tornou um bom recurso econômico, por ser de fácil cultivo e muito produtivo (SILVA FILHO et al., 1996). O fruto pertence à família Solanaceae, assim como o tomate (*Solanum lycopersicum*), a batata (*Solanum tuberosum* L.), a pimenta (*Capsicum* spp) e a berinjela (*Solanum melongena* L.) (SEQUI, 2016). Popularmente, seu consumo também vem sendo associado à finalidade de redução de colesterol sérico e controle glicêmico (SILVA FILHO et al., 2002).

Em 2015, o projeto Restauração de Áreas de Preservação Permanente (RAPPs), inseriu o maná-cubiu na região litorânea paranaense (FIGURA 2), mais precisamente na Mata Atlântica (BIASSIO, 2011). O meio de cultivo do maná-cubiu ainda é em pequena escala, ou seja, é produzido por agricultores locais e utilizado como matéria-prima na elaboração de subprodutos comercializáveis como sucos, geleias, compotas e alguns molhos. Por este motivo, o fruto apresenta vasto potencial para sociobiodiversidade local, com potencial de ser popularizado à diversidade brasileira (SILVA FILHO et al., 2002).

FIGURA 1 – MANÁ-CUBIU PRODUZIDO EM ANTONINA –PR



FONTE: A autora, 2018.

FIGURA 2 – REGIÃO DE CULTIVO DO MANÁ-CUBIU NO ESTADO DO PARANÁ



FONTE: Adaptado de Google Images (2018).

A relação entre os meios de cultivo agrícolas, respeitando a produção local com o objetivo de agregar valor socioambiental, geração de renda e segurança alimentar e nutricional de comunidades regionais e de agricultores familiares é o que caracteriza o conceito de sociobiodiversidade (BRASIL). Já é conhecido o elevado valor nutricional dos alimentos produzidos a partir deste meio de cultivo, uma vez que a produtividade obedece à demanda natural do solo, fatores ambientais e climáticos, assim como a sazonalidade, fator muito determinante para a composição nutricional dos frutos que serão colhidos (GRISA, 2007).

O Pólo de Agroecologia do litoral do estado do Paraná é um fórum de discussão e implementação de ações integradas de maneira permanente e que visa o desenvolvimento local da região. Foi constituído no ano de 1999 e tem como foco o desenvolvimento da agroecologia e da agricultura familiar. Além de articular a relação entre instituições, prioriza a segurança alimentar, a conservação ambiental e a inclusão social das regiões de Antonina, Morretes, Guaraqueçaba, Paranaguá, Guaratuba, Matinhos e Pontal do Paraná. Apesar da riqueza natural e cultural característica da região litoral norte do Paraná, a economia e os índices de qualidade de vida são baixos e estagnados. O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é de 0,512, e a longevidade da população local é inferior a 65 anos. Características como a frequência escolar (menor que 80%) e a renda *per capita* (menor que 0,49% do salário mínimo) também são dados discrepantes de toda a cultura e abundância dos recursos naturais ali presentes. Segundo o Diagnóstico da Agência de Desenvolvimento da Mesorregião do Vale do Ribeira/Guaraqueçaba, em 2002, os municípios mais pobres são aqueles que destruíram parte de suas reservas naturais para empregar outra atividade econômica em suas terras (AMARAL, 2007). Sendo assim, fazer o planejamento de estratégias que envolvam os vários setores relacionados ao Pólo de Agroecologia para adequada conservação dos recursos naturais, fortalecimento das comunidades e a inclusão social, são o principal desafio estabelecido. Para isso, faz-se necessária a associação da agroecologia e o potencial turístico da região para conservação e desenvolvimento do litoral do Paraná (AMARAL, 2007). Explorando este conceito em âmbito nacional, novos debates e fóruns de pesquisa foram ganhando enfoque e o interesse sobre a visão antropológica na alimentação, que expandiu após a década de 1990, graças à influência da economia e o turismo, dentro de gastronomia e culinária. Entretanto, pesquisas científicas sobre a temática em âmbito nacional tem crescido na última década, com novas contribuições sobre comida, simbolismo e identidade. (CANESQUI, 2007). O ato de alimentar-se e de alimentar ao próximo exhibe a complexidade da vida em sociedade. As práticas alimentares, assim como os hábitos adquiridos em comunidade, são o reflexo da história de vida de famílias e seus antepassados e o consequente acesso aos alimentos das regiões onde habitam, assim como a disponibilidade destes e a capacidade em adquiri-los. Para todos estes aspectos, a relação com o meio de

produção, modo de preparo e qualidade nutricional do alimento, também necessita ser disponíveis aos indivíduos que compõe esta comunidade. Faz-se necessário ainda ressaltar a cultura e a relação com os alimentos, seja por questões de espiritualidade e religião ou pela simples socialização. Promover a Segurança Alimentar e Nutricional de maneira sustentável, considerando cada um destes pontos, é uma responsabilidade coletiva da sociedade organizada em estado, do governo, sociedade civil e empresas. Sempre se relacionando às iniciativas governamentais, como políticas, programas e ações e às não governamentais, em políticas públicas capazes de garantir a realização do Direito Humano à Alimentação para todos (VALENTE, 2002). De modo geral, no Brasil, a disponibilidade de alimentos não é um problema frequente, não por adequação ou autonomia do sistema alimentar, mas a sustentabilidade do sistema de alimentação é bem comprometida e relaciona-se com a exclusão social e a falta dos direitos de cada cidadão. Esta desigualdade é o principal fator atual de adversidade neste quesito em ambiente nacional e se manifesta por desigualdades sociais graves e regionais (PEDRAZA, 2005).

Contraopondo estes problemas, graças à qualidade do solo e o período de cultivo anual, é possível viabilizar economicamente a redução dos custos e maior comercialização do fruto pelas populações produtoras e vulneráveis a estes riscos sociais, resultando em geração de renda e sustento para suas famílias (SILVA FILHO et al., 1998). É também esta mesma população que mais produz o maná-cubiu, quem mais desconhece suas potencialidades (SILVA FILHO et al., 2005). A agroindústria, por exemplo, após focar na industrialização e produção em maior escala deste fruto, acabou favorecendo o interesse por novos estudos sobre a caracterização genética do fruto e suas consequentes técnicas de produção e conservação e a partir de então, a indústria farmacêutica tem explorado o fruto como matéria-prima para elaboração de alguns cosméticos e medicamentos (SILVA FILHO et al., 2005).

A caracterização fenotípica e genotípica do maná-cubiu foi realizada por Silva Filho et al. (2005), e objetivou a avaliação da estrutura genética e características relacionadas ao processo produtivo e das 28 etnovarietades estudadas, nove diferentes fenótipos foram detectados, quase metade delas produziram frutos de forma globosa variando entre tamanho pequeno e grande, com predominância dos frutos pequenos e

médios. Esta prevalência pode estar associada à preferência da população amazonense em relação ao seu consumo, como por exemplo, na forma de utilizá-lo em substituição ao limão. Já os maiores frutos, com mais de 200g, são originários de Codajás, Estirão do Equador e de Barcelos - AM. E sua incidência pode relacionar-se com os processos de seleção dos frutos feitos pelos índios e caboclos da Amazônia Ocidental (SILVA FILHO et al., 1998). A espessura da polpa do maná-cubiu também varia conforme o tamanho do fruto. De modo geral, todas as variedades apresentaram grande variabilidade genética e em suas características agronômicas (SILVA FILHO *et al.*, 2005). Com relação à composição centesimal, Yuyama (2007) fez uma avaliação das etnovarietades de maná-cubiu, as quais apresentaram altos teores de umidade (aproximadamente 90%) e baixa concentração de proteínas (de 0,4 a 0,7%) e lipídios (de 0,3 a 1,8%). Cabe ressaltar que o material genético pesquisado no estudo independe da origem e do solo. No mesmo estudo, entre os minerais analisados, o potássio foi o de maior quantidade encontrada e o sódio foi o de menor concentração, mostrando-se uma opção importante aos pacientes com restrição desse micronutriente. O maná-cubiu também se revelou uma boa opção para compor a dieta amazonense, principalmente para aqueles indivíduos que necessitam restringir sódio da alimentação (SILVA FILHO et al., 2005). Para Yuyama (2007), a quantidade de fibra alimentar e a baixa densidade energética também incentivam sua utilização em dietas hipocalóricas. Sendo que do total de fibras presentes no fruto, a maior parte delas são fibras insolúveis (MAIA et al., 2015).

#### 2.1.2. Atividade biológica do maná-cubiu

Compostos bioativos possuem benefícios para saúde humana já conhecidos através de estudos com frutos e vegetais com atividade antioxidante, por exemplo. Compostos com esta atividade podem ser de diferentes classes químicas, tais como fenólicos, carotenoides e vitaminas, que desempenham papéis importantes como a prevenção de doenças cardiovasculares, aterosclerose e redução do risco de alguns tipos de câncer. A capacidade antioxidante de frutas e vegetais tem sido correlacionada ao seu teor de fenólicos totais, que pode ser afetado por diferentes fatores como o modo de cultivo, condições agronômicas, manipulação pós-colheita e estágio de maturação dos frutos. Além destas variáveis, a estrutura dos compostos fenólicos presentes no

alimento, o número de grupos hidroxila e sua distribuição na estrutura do composto também interferem na capacidade antioxidante da substância. Sendo assim, a determinação da capacidade antioxidante deve considerar as concentrações globais e a composição de compostos fenólicos dos frutos e vegetais analisados, mesmo que sejam apenas aqueles em quantidades mais abundantes (PALAFOX-CARLOS; YAHIA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2012).

Os flavonóides representam uma grande classe de compostos fenólicos encontrados em frutas, vegetais, cacau, chá, soja, vinho tinto e outros alimentos e produtos de origem vegetal. Estruturalmente, os flavonoides são constituídos por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos que formam um anel heterocíclico oxigenado. Os flavonoides são classificados como flavan-3-óis, flavanonas, flavonóis, antocianidinas, flavonas e isoflavonas com base em diferenças na estrutura genérica do anel C, grupos funcionais nos anéis e a posição em que o anel B está ligado ao anel C. Dentro de cada subclasse, os compostos individuais são caracterizados por hidroxilação e padrões de conjugação. A ingestão de flavonoides é relacionada inversamente ao desenvolvimento de muitas doenças associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose, doenças neurodegenerativas e o diabetes, apresentando, neste último caso, atividade relacionada à digestão de carboidratos, secreção e sinalização de insulina e absorção de glicose (BABU; LIU; GILBERT, 2013).

A atividade antioxidante do maná-cubiu foi avaliada por Mascato e colaboradores (2015), estudo no qual realizou-se triagem fitoquímica *in vitro*, a fim de identificar os principais compostos antioxidantes do extrato do fruto. Foram detectados alcalóides, ácidos orgânicos, fenóis e flavonóides no extrato hidroetanólico, enquanto o extrato aquoso apresentou antocianinas, gomas, taninos e mucilagem. Porém, como conclusão, embora os extratos tenham apresentado compostos químicos relacionados à atividade antioxidante, não foram resultados tão expressivos, sendo necessários estudos adicionais para isolar e caracterizar compostos específicos para avaliação. Este dado foi semelhante ao encontrado por outros autores (GONÇALVES, et al. 2013), que incluíram que o extrato demonstra potencial antioxidante, porém se fazem necessários estudos adicionais para usar esta propriedade no setor farmacêutico. Este mesmo estudo avaliou



a atividade antimicrobiana contra estirpes testadas, mas sem resultados significativos. O destaque para a pesquisa foram os resultados promissores do extrato no uso de cicatrização de feridas, testado em coelhos.

### 2.1.3. Atividade hipoglicemiante e hipolipemiante do maná-cubiu

Diabetes Melitus é uma desordem metabólica que acomete 25% da população mundial, o tipo 2 (DM2) geralmente acomete indivíduos obesos e está associado à hipertensão e dislipidemia, enquanto que o tipo 1 (DM1), na maioria dos casos, é causado pela falta de produção endógena de insulina pelo pâncreas (ARUMUGAM; MANJULA; PAARI, 2013). A insulina e o glucagon são os principais hormônios responsáveis pelo controle glicêmico. Após a ingestão de carboidratos, suas moléculas são digeridas no trato gastrointestinal superior e hidrolisadas em monossacarídeos, com consequente absorção na corrente sanguínea através de vários transportadores de glicose (GLUT). Uma vez na circulação sanguínea, a glicose é transportada para células  $\beta$  pancreáticas das ilhotas de Langerhans através do sistema transportador de glicose, GLUT2, estimulando a secreção de insulina que por sua vez, reduz a glicemia. Esta redução da glicemia causada pela insulina caracteriza um aumento da absorção de glicose nos tecidos periféricos (músculo esquelético, tecido adiposo e rim); promove a utilização e armazenamento de glicose hepática e inibe a lipólise. Já o glucagon age quando os níveis de glicose sérica estão baixos, sendo secretado pelas células  $\alpha$  das ilhotas pancreáticas. Seu mecanismo de ação se dá pelo aumento da glicemia devido à produção de glicose e sua liberação hepática ou pelo aumento da lipólise e liberação de ácidos graxos do tecido adiposo. A insulina é bastante utilizada como tratamento do diabetes, principalmente do tipo 1. No caso do DM2, o uso de fármacos hipoglicemiantes orais são mais utilizados, sendo que as quatro principais classes destes medicamentos são: sulfonilureias, biguanidas, tiazolidinedionas (TZDs) e inibidor de  $\alpha$ -glucosidase (BABU; LIU; GILBERT, 2013).

Considerando que o diabetes acomete 8% dos brasileiros entre 30 e 69 anos, a prevenção da doença por meio de fontes naturais de tratamento são estratégias que devem estar em constante pesquisa (YUYAMA et al., 2005). Neste contexto, Yuyama et al. (2008) avaliaram o uso do maná-cubiu como matéria-prima na elaboração de geleia

dietética, fazendo uso do xilitol em substituição à sacarose e sua aceitabilidade e vida-de-prateleira. Tal estudo foi justificado pela contribuição do fruto, empregado desta forma, no desenvolvimento sócio-econômico da Região Amazônica e nos benefícios aos pacientes diabéticos e/ou com restrição de sacarose. Para atender às necessidades desses indivíduos, vários estudos têm sido realizados sobre a utilização de edulcorantes. O xilitol é um álcool pentahidroxilado capaz de substituir a sacarose, tendo seu metabolismo independente de insulina. Além do maná-cubiu, outros frutos e vegetais como uva, morango, alface, cebola e cenoura também são fontes naturais de xilitol. No caso deste estudo, o produto final (geleia dietética) mostrou-se bem aceito e com características sensoriais satisfatórias mesmo sendo de baixo teor energético, podendo então ser utilizado como substituto ao produto convencional não só para indivíduos com as restrições alimentares citadas (YUYAMA et al., 2005). Os compostos de plantas são opções de tratamento naturais e muito vantajosas, por serem de natureza abundante, de baixo custo para produção e por apresentarem menos efeitos colaterais do que os compostos farmacêuticos usados atualmente (BABU; LIU; GILBERT, 2013).

O uso de fármacos também é um dos tratamentos mais utilizados para hipercolesterolemia, porém, assim como no uso de fármacos hipoglicemiantes, este tipo de tratamento pode apresentar efeitos colaterais. Por este motivo, o uso de plantas e frutos com tal atividade, poderia contribuir para a redução das doses farmacológicas, atuando como coadjuvantes no tratamento e reduzindo assim, os consequentes efeitos colaterais do tratamento. A alteração do perfil lipídico pode ser ocasionada pelo estilo de vida moderno, principalmente ocidental, caracterizado pela redução da prática de atividade física, alta ingestão de alimentos ricos em gorduras e o baixo consumo de vegetais, que possuem antioxidantes e fibras, os quais possuem efeitos na redução das concentrações de colesterol sanguíneo e na redução da absorção intestinal de lipídeos. O indivíduo com hipercolesterolemia torna-se predisposto ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo responsável pela maior parte do número de mortes precoces em adultos por este motivo (MAIA et al, 2015).

O efeito hipolipemiante do maná-cubiu também vem sendo explorado por pesquisas científicas e em uma das análises para comprovar os efeitos do fruto sobre os marcadores do perfil lipídico, avaliou-se o efeito da farinha de maná-cubiu sobre a

lipemia de ratos hipercolesterolêmicos. A administração da farinha do fruto reduziu as concentrações de colesterol total, LDL-colesterol e colesterol hepático, e aumentou a excreção de colesterol pelas fezes e o HDL-colesterol nos ratos. Os resultados apresentados confirmam a hipótese levantada pelo uso popular do fruto como hipocolesteremiante (MAIA et al., 2015). Com o mesmo intuito de comprovar a afirmativa popular, de que o fruto seria eficaz como hipoglicemiante, Yuyama et al. em 2005, realizaram um estudo experimental com ratos, no qual os frutos previamente despulpados, foram secos e analisados quanto à composição centesimal, fibra alimentar, elementos minerais e então administrados como suplemento alimentar na dieta dos ratos com diabetes previamente induzida, artificialmente, com estreptozotocina na dose de 40 mg/kg. Após o período de duas semanas, os animais foram selecionados de acordo com a concentração de glicose sérica (valores superiores a 300 mg/dL) e distribuídos em dois grupos com dez ratos em cada. A dieta base para os animais foi a ração de caseína e variou apenas a fonte de fibra alimentar da dieta. Os resultados demonstraram que o maná-cubiu apresentou baixo teor energético (24 kcal/100g) e 3,6% de fibra alimentar. Após as quatro semanas de experimentos, os ratos que receberam a fibra do fruto apresentaram uma redução de glicose no sangue quando comparado com o grupo controle, sugerindo a influência do fruto na redução da concentração de glicose em ratos.

#### 2.1.4. Experimentação animal

Acerca do diabetes e outros problemas de saúde, muitos estudos vem sendo realizados a fim de esclarecer mecanismos e consequências das enfermidades à saúde humana. Entretanto, a intervenção primária para investigação destes efeitos e o uso de fármacos e outros meios de tratamento, não são seguros e corretos do ponto de vista ético para serem aplicados em humanos. Assim, inicialmente, a experimentação animal é um dos recursos mais empregados e mais eficazes para tais pesquisas. No caso do Diabetes Mellitus, para que seja possível a tentativa de controle e/ou tratamento, os animais devem passar pelo processo de indução da doença para que venham a passar pela intervenção de testes. Para tornar os ratos diabéticos, as substâncias mais utilizadas são a aloxana e a estreptozotocina, sendo que a dose administrada varia

conforme a espécie e o peso do animal. Tendo como base os estudos de experimentação que utilizam a indução do diabetes, grande parte deles utiliza entre cinco e doze animais para as análises (BRAGA, MEDEIROS e ARAÚJO, 2010; DERIVI et al., 2002; FILHO, 2009; LEME, et al., 2010; LERCO et al., 2003; OLIVEIRA, 2008; ROCHA, 2010; SILVA et al., 2004; YUYAMA et al., 2005). A indução química do diabetes com estreptozotocina é o modelo mais frequentemente utilizado para ratos e são administradas principalmente por via intraperitoneal e intravenosa. Diferentes doses são descritas na literatura, variando de 35 mg/kg a 80 mg/kg, e em menor número, referências de 150 a 200 mg/kg. O principal mecanismo para promover a morte das células beta-pancreáticas é pela alquilação do seu DNA, tornando os animais induzidos, em modelos de diabetes tipo 1 (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016).

Existem ainda modelos animais que abordam condições ligadas ao desenvolvimento de doenças e agravos não transmissíveis além do diabetes, que mimetizam quadros de resistência à insulina, hiperglicemia e obesidade, são o caso de modelos animais de diabetes tipo 2 (DM2). A indução do DM2 pode ser realizada pela administração de glicocorticoides, com o uso de doses frequentes que elevam a concentração plasmática desses hormônios e a responsividade à bloqueios farmacológicos. Uma vez causada a resistência periférica a insulina, hipertensão arterial e aumento da atividade geral do sistema nervoso simpático, são observadas condições semelhantes aos indivíduos diabéticos tipo 2. Administração neonatal de glutamato monossódico é outro método para promover o DM2 em animais, graças ao efeito neurotóxico que causa lesão do núcleo arqueado do hipotálamo. Assim, há menor produção de GH, hipercorticosteronemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistência à insulina, menor atividade da proteína transportadora de GLUT 4, menor atividade de tecido adiposo marrom e maior deposição de gordura visceral. Desta forma, representa bem as complicações do DM 2 e as complicações metabólicas da obesidade. Estas vias de indução permitem o estudo do fator dietético após a instalação da condição patológica, possibilitando o estudo da relação entre o consumo/intervenção e o prognóstico da doença instalada. Modelos animais resistentes à insulina também podem ser instituídos por mudanças no padrão alimentar, substituindo a sacarose da dieta comercial padrão (AIN-93) por frutose. Esta alteração desencadeia eventos metabólicos

que inibem a enzima fosfofrutoquinase e a via glicolítica e após curto período de tempo é possível observar mudanças metabólicas como hipertrigliceridemia, resistência insulínica e hipertensão arterial. A dieta de cafeteria é outra forma de induzir estas alterações por via dietética, sua aplicabilidade em estudos científicos possibilita estudo dos padrões de consumo, por exemplo (COSTA et al., 2014).

Dentre as espécies mais utilizadas em experimentos, os ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar são os mais citados pelos autores, primeiramente por apresentarem DNA mais semelhantes ao DNA humano e também por serem considerados mais resistentes aos experimentos (MATTARAIA; MOURA, 2012). Ratos também são de uma das espécies de mais fácil manutenção e menor custo para serem empregados em experimentos, principalmente pelo tamanho dos animais, que acabam por reduzir o espaço físico necessário. Além disso, a espécie é bastante compatível com mudanças na dieta, aspecto importante para experimentação nutricional. Há décadas, pesquisas têm definido as necessidades nutricionais de ratos e é relativamente fácil desenhar um experimento em que a dieta é modificada para atender requisitos para testar os efeitos dos componentes individuais e nutricionais. No entanto, existem algumas desvantagens óbvias: eles possuem vida curta e, por isso, não são susceptíveis a algumas das doenças crônicas associadas ao envelhecimento, como os seres humanos, doenças cardiovasculares, por exemplo. Mas esta é uma área de pesquisa em que a experimentação animal obteve alguns dos mais significativos resultados que contribuíram para a compreensão da relação entre dieta e algumas doenças (LOVEGROVE et al., 2015).

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. MATERIAL

Os frutos foram adquiridos em maio de 2016, na Associação dos Pequenos Produtores Rurais de Antonina –PR (ASPRAN), situada na estrada Rio Pequeno, s/n, Cachoeira, no município de Antonina, no litoral do estado do Paraná, Brasil (Latitude 25° 16'31" S e Longitude 4° 41'55" O), totalizando a quantidade de 25kg. O transporte foi feito com o acondicionamento dos frutos em caixas isotérmicas até o laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

A autorização de acesso ao patrimônio genético com número 010004/2015-7 está em anexo (ANEXO 1). O material foi previamente identificado no Museu Botânico de Curitiba mediante depósito de uma exsicata no Herbário Municipal sob o número 379033 (ANEXO 2). O presente estudo pertence ao projeto “Qualidade Nutricional e Fitoquímica de Frutos da Sociobiodiversidade” aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 010004/2015-7), que busca a promoção do consumo de frutos brasileiros.

### 2.2.2. MÉTODOS

#### 2.2.2.1. Caracterização dos frutos

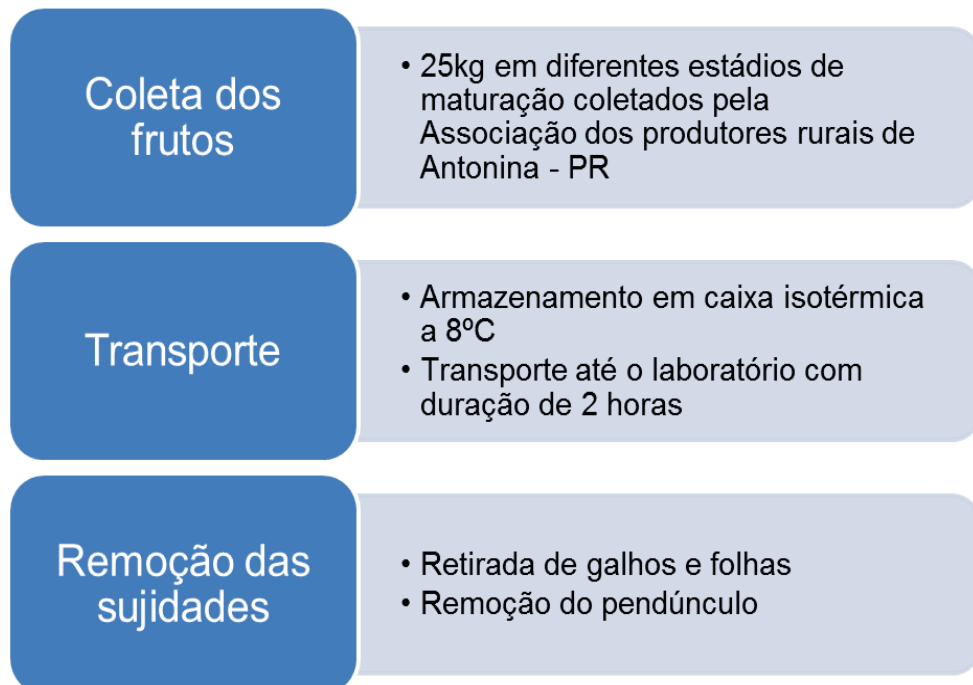
Após prévia higienização com hipoclorito (200ppm), a análise física dos frutos coletados foi realizada primeiramente a partir da pesagem individual de 25 unidades de frutos, os quais foram identificados conforme seu estágio de maturação e classificados conforme a intensidade da ocorrência de defeitos. Para pesagem foi utilizada uma balança analítica (*Adventurer AR2140®*), com especificidade de duas casas decimais e as dimensões dos frutos, obtidas em paquímetro com precisão de 0,01mm (*Lee Tools 684132®*), assim como a determinação do diâmetro longitudinal e do diâmetro transversal, expressas em milímetros. Estas avaliações foram realizadas em triplicata. Para cada determinação realizada foram calculados os valores mínimos e máximos, média, mediana e desvio padrão.

A classificação segundo o estágio de maturação foi realizada de acordo com a coloração. Frutos considerados verdes são aqueles de coloração predominantemente

verde; os parcialmente verdes, com até 50% desta coloração; frutos amarelos com a cor amarela em sua totalidade; frutos considerados no estágio intermediário grau 1 (intermediário1) são aqueles com até 50% da casca de coloração amarela/alaranjada; o grau intermediário 2, com mais de 50% alaranjado e os maduros, com 100% da casca de coloração alaranjada com tonalidade mais escura.

A intensidade da ocorrência de defeitos foi convertida em porcentagem de acordo com a incidência destes defeitos em relação a quantidade total de frutos avaliados. Os defeitos considerados foram: ocorrência de manchas, deformações, danos mecânicos ou sinais de apodrecimento (FAO/INFOODS, 2003). Após a caracterização da amostra e sequente classificação dos estádios de maturação, o total de frutos (25kg) foram separados em casca, polpa, semente e resíduos para avaliação do rendimento, sendo que parte dos frutos foram mantidos com a casca, referente a fração “polpa com casca”. Todas as etapas da metodologia estão descritas no delineamento apresentado na FIGURA 3.

FIGURA 3 – DELINEAMENTO DO ESTUDO



Caracterização físico-química	<ul style="list-style-type: none"><li>• Umidade, cinzas, acidez e pH</li><li>• Proteínas, lipídeos e açúcares totais</li></ul>
Liofilização	
Obtenção dos extratos etanólicos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Polpa com semente</li><li>• Casca</li></ul>
Atividade antioxidante	<ul style="list-style-type: none"><li>• ABTS, DPPH, Fosfomolibdênio</li><li>• Fenólicos totais e flavonóides</li></ul>
Toxicidade preliminar	<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Artemia Salina</i></li></ul>
Efeito hipoglicemiante <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Extratos etanólicos do fruto inteiro, da polpa e da casca no estágio de maturação intermediário 2</li><li>• Administrados via gavagem em ratos com diabetes induzida</li></ul>

FONTE: A autora (2018).



#### 2.2.2.2. Caracterização físico-química

Para realização das análises físico-químicas foram utilizados os frutos do estágio de maturação grau 2, estágio preliminar ao maior grau de maturação para consumo. Dentre as análises realizadas estão a determinação de cinzas, sólidos totais, umidade, lipídeos, proteínas, acidez, pH e açúcares totais.

A determinação de cinzas foi determinada pelo método de resíduo por incineração; sólidos totais, por refratometria gravimétrica; umidade pelo método de secagem direta em estufa à 105°C; lipídeos por extração direta Soxhlet; Acidez e pH determinadas pelos métodos oficiais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). A determinação de açúcares totais foi realizada pelo método químico clássico (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944). A quantificação de proteínas foi realizada pelo teor de nitrogênio total das amostras, foi utilizado o fator de 5,75 para conversão de nitrogênio em proteínas, conforme método AOAC (AOAC, 2005).

#### 2.2.2.3. Obtenção dos extratos

Os extratos da casca e da polpa do fruto foram obtidos a partir de metodologia descrita por Carvalho (2001). O extrato bruto etanólico de cada uma das partes foi obtido em aparelho de Soxhlet, utilizando álcool etílico 80% como solvente, a partir do pó do fruto, liofilizado previamente. Após a adição da amostra e de álcool etílico no Soxhlet, todo o sistema foi levado ao aquecimento (80°C) e deixado em refluxo contínuo por aproximadamente 6 horas para que o solvente pudesse realizar uma adequada extração dos compostos bioativos do fruto. O filtrado dos extratos foi concentrado em banho-maria a 60°C e utilizado para as análises seguintes.

#### 2.2.2.4. Atividade Antioxidante

##### 2.2.2.4.1. Capacidade de redução do radical DPPH

A análise foi realizada de acordo com o método adaptado de Mensor et al. (2001), o qual avalia a atividade seqüestradora do radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 518 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarelada, com conseqüente desaparecimento da absorção,

podendo ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A porcentagem de atividade antioxidante foi determinada a partir dos resultados obtidos. Foi preparada uma solução de DPPH minutos antes do ensaio a 0,03 mmol/mL em metanol absoluto. Foram preparadas sete diluições de cada amostra, com concentrações que variaram entre 50 µg/mL a 950 µg/mL e, em seguida, foram pipetados 142 µL de cada amostra, em triplicata, em uma microplaca de 96 poços e adicionados 58 µL da solução de DPPH. Para cada amostra foi preparado um branco com 142 µL da solução de cada concentração da amostra e 58 µL de metanol. Paralelamente foi realizado um controle negativo com 142 µL de metanol e 58 µL de DPPH. Como padrões foram utilizados a vitamina C (1,6 a 8 µg/mL) e a rutina (2,0 a 12 µg/mL). Após 30 minutos em ambiente escuro, a absorbância (Abs) das soluções foi medida em 518 nm e, em seguida, a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) calculada através da fórmula abaixo:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle}}$$

Foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (CE<sub>50</sub>) em gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. Através dos pontos, foi traçada a linha de tendência e obtida a equação da reta, tanto para os padrões, quanto para as amostras. Esta equação, do tipo  $y = ax + b$ , serviu de base para determinação do valor de CE<sub>50</sub>.

#### 2.2.2.4.2. Formação do complexo fosfomolibdênio

O teste de complexação pelo fosfomolibdênio foi realizado de acordo com Prieto, Pineda e Aguilar (1999), neste método é possível avaliar a capacidade antioxidante dos componentes lipofílicos e hidrofílicos. A técnica baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, pela amostra analisada, formando um complexo fosfato-molibdênio V, de coloração verde quando em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente a 695 nm. Para a reação de formação do complexo, o reativo foi preparado no dia da análise, sendo composto pela solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), o volume das soluções foi completado com

água para 100 mL. As soluções padrões de vitamina C e rutina, além das amostras testadas, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL de metanol. Em um tubo de ensaio, foi pipetada uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra, com mais 1 mL de reativo. Para o branco foram utilizados 0,3 mL de metanol e 1 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata para todas amostras. Os tubos foram fechados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos e depois resfriados até atingir a temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro UV da marca Shimadzu®, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina. As seguintes fórmulas demonstram o cálculo de atividade antioxidante comparativamente a rutina e vitamina C.

AA% em relação à Rutina =  $\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$

AA% em relação à Vitamina C =  $\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$

#### 2.2.2.4.3. Atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2' - azinobis - (3-ethylbenzothiazoline-6- sulfonic acid)] foi feita conforme a metodologia descrita por Rufino et al.(2007). O radical ABTS foi formado pela reação de 5 mL da solução ABTS.+ 7mM com 88 µL da solução de persulfato de potássio 140mM, incubados à temperatura de 25°C e na ausência de luz, durante 16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorvância de 0,700±0,020 a 734nm. Para a curva de calibração preparou-se uma solução padrão de Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, na concentração 2 mM. Primeiramente, diluiu-se 25 mg deste composto em álcool etílico até completar o volume para 50 mL em balão volumétrico. A partir desta solução, foram preparadas em balões volumétricos de 10 mL, soluções variando a concentração de 100 a 2000 µM. Em ambiente escuro, transferiu-se 100 µL de cada solução de trolox para tubos de ensaio, contendo 10 mL da solução do

radical ABTS. A leitura foi realizada após 6 minutos da mistura. O álcool etílico foi utilizado como branco na calibração do equipamento. Sendo assim, plotou-se as concentrações de Trolox ( $\mu\text{M}$ ) no eixo x e as respectivas absorbâncias no eixo y e calculou-se a equação da reta.

A determinação da atividade antioxidante total nos extratos foi feita a partir do extrato de cada porção do fruto (polpa, casca e semente). Foram preparadas três diluições diferentes (1000, 25000 e 50000 mg/L), em triplicata. Em ambiente escuro, transferiu-se a alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 10 mL do radical ABTS. A leitura foi feita após 6 minutos de reação a 734 nm, e o etanol foi utilizado como branco. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotou-se a absorbância no eixo y e a diluição (mg/L) no eixo x. Em seguida, determinou-se a equação da reta. O cálculo da atividade antioxidante (ATT) foi feito substituindo na equação da reta a absorbância equivalente a 1000  $\mu\text{M}$  do padrão Trolox. O valor obtido para o termo x corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000  $\mu\text{M}$  de Trolox, conforme equação:

$$y = -ax + b$$

Onde: y = Absorbância correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  de trolox

x= diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1000  $\mu\text{M}$  de Trolox

A partir do resultado encontrado (x) na primeira equação, dividiu-se por 1000 para ter o valor em g. Conforme equação:

$$X (\text{g}) = x / 1000$$

#### 2.2.2.4.4. Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método adaptado de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) em que o ácido gálico é utilizado como padrão de referência. Neste método ocorre a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras, formando um complexo de coloração azul. Aproximadamente 0,1g de cada amostra (casca, polpa e semente) foram adicionados de 10mL de metanol em tubos tipo Falcon para centrifugação durante 5 minutos. Após, o procedimento foi repetido uma segunda vez. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as amostras foram

transferidas para um balão de 25mL e completado com metanol. Alíquotas de 20µL de cada amostra foram pipetadas em triplicata em uma microplaca de 96 poços com 130 µL de água destilada, 20 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 30 µL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 7,5% (m/v). Para o branco foram pipetados 20 µL de água destilada em substituição à amostra. As amostras foram conduzidas a banho de 37°C por meia hora e a leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 765 nm. A quantificação de fenólicos totais nos extratos foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em mg AG/100g de fruto.

#### 2.2.2.4.5. Determinação de flavonoides totais

A determinação de flavonoides dos extratos foi realizada conforme metodologia adaptada de Meda et al. (2005). Foram pipetados 100 µl de água destilada para o branco e em triplicata foram pipetados 100 µl de cada ponto da curva padrão de quercetina e amostras. Posteriormente, foram acrescentados 100 µl de cloreto de alumínio 2%, realizada agitação e permanecendo em temperatura ambiente por uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420nm. O resultado foi calculado como equivalente de quercetina (QE).

#### 2.2.2.5. Análise de toxicidade preliminar

Foram adquiridos os ovos de crustáceo da espécie *Artemia salina* e a técnica utilizada para o ensaio foi realizada conforme metodologia citada por Meyer et al. (1982). Os ovos do microcrustáceo foram eclodidos em água salina, preparada com 14,31 g de sal marinho dissolvido em 400 mL de água destilada. Para esta volume, foram adicionados 200 mg dos ovos do microcrustáceo. O pH foi mantido entre 8 e 9 e a temperatura foi controlada entre 27°C e 30°C. A solução foi mantida sob agitação e aeração constante por 48 horas, além de iluminação (20 W) sobre o recipiente. A solução com o extrato foi preparada com as frações em concentrações de 1000 µL/mL, 500 µL/mL, 100 µL/mL e 10 µL/mL, todos em triplicata. Foram colocados 10 *Artemias* em cada frasco para possibilitar, posteriormente, a visualização dos microcrustáceos vivos. Os frascos com as soluções foram colocados em estufa para total eliminação do solvente (metanol), inclusive o controle, apenas com o solvente utilizado na dissolução

das amostras. Após total evaporação, os microcrustáceos foram adicionados ao frasco com uma pipeta Pasteur. Após 24 horas, foram observados o número de *Artemias* vivas e mortas em cada uma das concentrações analisadas. Por fim, foi calculada a dose letal média (DL<sub>50</sub>). As frações foram consideradas ativas quando DL<sub>50</sub> foi menor que 1000 µg/mL (MEYER et al., 1982).

#### 2.2.2.6. Efeito hipoglicemiante *in vivo*

Inicialmente foi realizada uma etapa piloto para avaliação da viabilidade e otimização da metodologia. Nesta etapa foram utilizados 18 ratos Wistar albinos machos com aproximadamente 60 dias de vida e pesando em torno de 250 gramas, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O projeto foi aprovado para execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), (ANEXO 3). Todos os animais passaram por um período de ambientação de quinze dias após a chegada ao laboratório de experimentação. Neste período os animais não foram submetidos a qualquer procedimento experimental, apenas pesagem e aferição da glicemia a título de comparação posterior aos resultados obtidos nas semanas de intervenção. Os ratos foram mantidos em grupos de três animais por caixa, separados aleatoriamente, de forma que cada caixa representasse um grupo experimental, totalizando assim, seis caixas.

Os grupos experimentais foram categorizados da seguinte forma: Grupo 1: saudável não intervenção (grupo controle, recebeu apenas dieta com ração comercial AIN-93); Grupo 2: diabéticos não intervenção (ratos com a doença induzida que receberam dieta com ração comercial AIN-93); Grupo 3: Diabéticos com intervenção receberam extrato do fruto inteiro na concentração de 100mg/kg; Grupo 4: Diabéticos com intervenção que receberam o extrato do fruto inteiro na concentração de 200mg/kg; Grupo 5: Diabéticos com intervenção receberam extrato do fruto sem casca na concentração de 100mg/kg; e por fim, Grupo 6: Diabéticos intervenção, que receberam o extrato da casca de maná-cubiu na concentração de 20mg/kg.

Durante as seis semanas em que os animais permaneceram no laboratório (duas semanas de ambientação e quatro de intervenção) todos os animais receberam água e ração comercial AIN-93 (Nuvilab - Quimtia®) *ad libitum*. A temperatura foi

controlada e mantida entre 21 e 23°C, assim como o ciclo claro-escuro de 12-12h, controlado por timer. Quinze animais do total de dezoito (todos os grupos, exceto grupo 1 – controle saudável) foram induzidos ao diabetes tipo 1 com uma única aplicação de estreptozotocina (STZ), dissolvida em tampão de citrato 2% com pH6, via intraperitoneal (i.p.), em uma dose de 60mg/kg de peso para cada animal. Todos os ratos, incluindo o grupo controle saudável, foram submetidos ao jejum de 24 horas, previamente à indução. Após 72 horas da aplicação de STZ, foi avaliada a glicemia capilar, utilizando um glicosímetro portátil (*FreeStyle Freedom Lite, Abbott®*) e a confirmação do diabetes se deu pelos níveis de glicemia superiores a 200 mg/dl (YOSHINO et al., 1989).

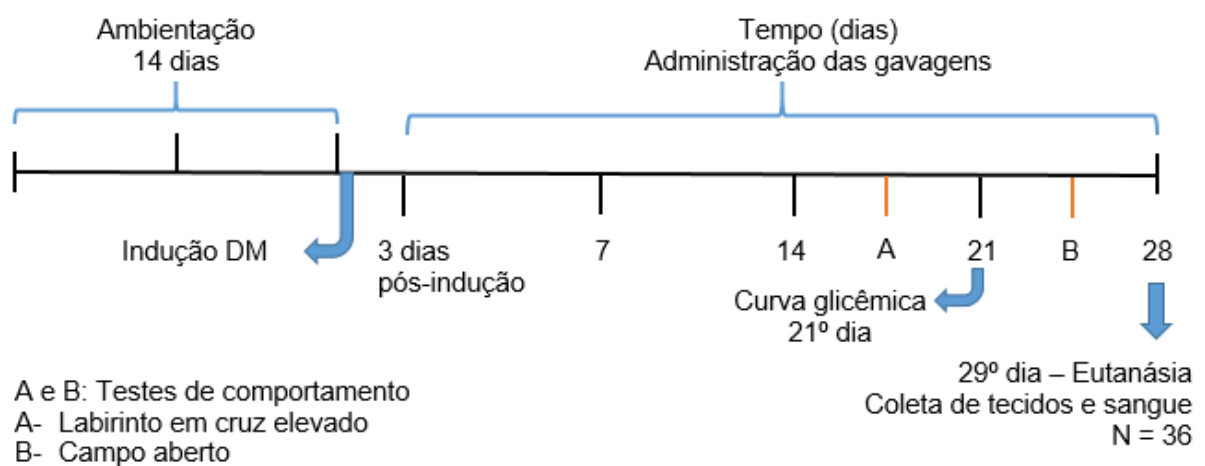
Os extratos utilizados para administração via gavagem esofágica nos grupos intervenção foram produzidos em uma única etapa para evitar possíveis alterações do processo de extração, sendo utilizados apenas frutos liofilizados de estágio de maturação intermediário 2 e álcool etílico 80% como solvente, com posterior evaporação do mesmo. Desta forma, o extrato em estado sólido foi pesado semanalmente, conforme a dose por quilo de peso para cada animal e então ser dissolvido em 0,5 ml água destilada, conforme metodologia adaptada de GANDI e RAO, 2015. Os extratos foram mantidos sob refrigeração (4°C) até o momento de preparo e administração. As doses estabelecidas, de 100mg/kg e 200mg/kg para o fruto inteiro; 100mg/kg para a polpa; e 20 mg/kg para a casca do fruto, foram estabelecidas por cálculos de correlação para a quantidade consumo humano possível de ser consumida diariamente. Ou seja, as doses dos extratos do fruto inteiro (100 e 200 mg/kg) equivalem ao consumo de 2 e 4 frutos inteiros por dia para um indivíduo de aproximadamente 70kg, respectivamente; a dose do extrato da polpa, também equivale ao consumo de 2 frutos sem a casca/indivíduo de 70kg/dia; e o extrato da casca, equivale ao consumo de 2 colheres sopa da casca do fruto, ou 30g, por dia para o mesmo indivíduo.

Os animais pertencentes aos grupos controle, tanto diabético, quanto saudável, não receberam nenhum extrato. Porém, também foram submetidos ao procedimento de gavagem, utilizando apenas água destilada na administração, a fim de evitar resultados discrepantes no controle glicêmico devido à exposição dos animais ao estresse. A gavagem foi realizada diariamente, entre as 9h e as 11h, durante 28 dias (FIGURA 4). Ao final deste período, os ratos foram eutanasiados sob anestesia com solução de cetamina

10% e xilazina 2% (150mg/kg e 15mg/kg respectivamente), para posterior coleta dos materiais biológicos e realização de análises histológicas e bioquímicas.

Na segunda etapa de experimentação, 36 animais foram solicitados ao biotério com as mesmas características dos animais da etapa piloto. Os ajustes realizados para a segunda fase do experimento foram: a dose da medicação para indução do diabetes, reduzida para 50mg/kg; a inclusão do jejum de 2 horas previamente à gavagem, diariamente; a utilização da curva glicêmica no vigésimo primeiro dia de experimento, para avaliação do efeito imediato do extrato na glicemia; e o controle de consumo de alimento e água realizado duas vezes por semana.

FIGURA 4 – DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO *in vivo*



FONTE: A autora (2018).

#### 2.2.2.6.1. Análises Bioquímicas

A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca no momento da eutanásia, com os animais previamente sedados. Cerca de 2 mL do sangue coletado foi mantido em tubo de coleta com EDTA e enviado para análise de hemoglobina glicada em laboratório externo imediatamente após a coleta. Outros 2 mL da amostra coletada foram centrifugados a 3500RPM durante 15 minutos para separação do soro com auxílio de micropipeta. Os demais exames bioquímicos foram realizados no laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia de Universidade Federal do Paraná, nos grupos



controle, diabéticos não tratados e diabéticos tratados com os extratos. As amostras foram mantidas congeladas a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento de análise. O soro utilizado para realização dos exames bioquímicos foi descongelado e pipetado (200  $\mu\text{l}$ ) em ependorffs acondicionados na raque de leitura do equipamento (CobasMira - Roche  $\text{\textcircled{R}}$ ). Para os testes de glicemia, triglicerídeos e colesterol total foram utilizados os kits comerciais com monoreagentes. AST, ALT, creatinina e uréia, birreagentes, em uma proporção de 2:1 de cada reagente e homogeneizados, conforme indicação do fabricante. Para determinação dos valores de colesterol HDL foi realizada anteriormente de maneira manual a fase de precipitação com o kit comercial LabTest $\text{\textcircled{R}}$ . Colocou-se 150  $\mu\text{l}$  de soro de cada amostra em um tubo de ensaio de vidro para hemólise com 150  $\mu\text{l}$  de precipitante e agitado por 30 segundos em agitador de tubos e centrifugado a 3500RPM durante 15 minutos para precipitação das lipoproteínas de baixa densidade. O sobrenadante foi então utilizado para determinação dos valores de HDL colesterol com o mesmo kit de determinação para colesterol total. A glicemia foi determinada pelo método glicose oxidase/peroxidase (GOD/POD), utilizando o kit disponível comercialmente pela empresa LabTest $\text{\textcircled{R}}$ . Para as dosagens de hemoglobina glicada, o método utilizado foi por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Triglicerídeos, com o método enzimático colorimétrico. Para avaliação da função renal e hepática, foram utilizados os kits comerciais LabTest $\text{\textcircled{R}}$ . Uréia, AST e ALT, realizadas pelo método cinético ultravioleta e creatinina pelo método cinético de dois pontos. Todos os exames bioquímicos, com exceção da hemoglobina glicada, foram realizados no aparelho COBAS $\text{\textcircled{R}}$ . Para determinação dos valores séricos de LDL-colesterol, colesterol não-HDL e VLDL foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{VLDL} = \text{Triglicerídeos} / 5$$

$$\text{LDL} = \text{colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

$$\text{Colesterol não-HDL} = \text{total} - \text{HDL}$$

#### 2.2.2.6.2. Análise Histopatológica

Os tecidos hepático, renal, pancreático, cardíaco, pulmonar e do baço foram dessecados após a eutanásia e pesados em balança semianalítica. As análises histopatológicas foram realizadas segundo metodologia de RIBEIRO, FILHO e

GROTZNER (2012), apenas com os tecidos do fígado, rim e pâncreas, através da coloração H.E. (hematoxilina/eosina), utilizando apenas parte do tecido total coletado dos animais. Para técnica histopatológica, as amostras de tecidos hepático, renal e pancreático foram coletadas e cortadas em tamanho equivalente a um terço do tamanho total de cada órgão. O acondicionamento em fixador ALFAC foi mantido por 16 horas, em um volume equivalente a 5 vezes o volume das peças histológicas. No dia seguinte, retirou-se o fixador e a conservação foi feita em álcool 70% até o preparo para início das análises. O fixador ALFAC foi preparado uma hora antes de ser utilizado, sendo composto de 85ml de álcool 80%, 10ml de formaldeído P.A. e 5ml de ácido acético glacial, para um rendimento de 100ml.

As peças histológicas foram mantidas em álcool 70% até o dia anterior ao processamento das mesmas, neste momento o álcool 70% foi removido dos frascos e substituído por álcool 80%, dando início ao processo de desidratação. Conseqüentemente, após 1 hora em álcool 80%, as peças permaneceram por mais 1 hora em álcool 85%, posteriormente, substituído por álcool 90% pelo mesmo período de 1h e finalmente mantido em álcool 95% overnight. No dia seguinte, o álcool 95% foi substituído pelo álcool P.A., permanecendo por 1h e substituído novamente por álcool P.A. para então dar início ao processo de processamento do material analisado.

Os tecidos foram mantidos por 30 minutos em xilol e transferidos por mais 15 minutos para outro banho de xilol, até ser possível observar as extremidades das peças translúcidas, processo conhecido como diafanização, ou seja, remoção das impurezas. A etapa seguinte consistiu em manter as amostras teciduais em parafina (em estado líquido) por 60 minutos na estufa a 60°C, para então incluir novamente parafina e manter por mais 90 minutos em estufa a 60 °C. Para inclusão das amostras, foram utilizadas formas de papel previamente identificadas com a marcação de cada peça e completadas com parafina até um terço de sua capacidade, os tecidos foram retirados dos recipientes em que foram mantidos na estufa e transferidos, com o auxílio de uma pinça, para as formas de papel, posicionados no centro e com a maior superfície voltada para cima. Para secar a parafina, as formas de papel com as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até o dia seguinte. Para prisma os cubos enrijecidos de parafina contendo as amostras, foi utilizada uma faca para retirar as bordas e o restante do

parafina ao redor do tecido foi derretido utilizando uma chapa de metal aquecida por lamparina.

A microtomia foi realizada após a fixação dos cubos de parafina já prismados em madeira, para dar suporte ao micrótomo e segurar a peça para o corte. A fixação do cubo na madeira foi feita com o derretimento da superfície inferior do cubo, com uma lamparina, e fixado ainda quente na madeira, mantido em geladeira para enrijecer novamente. O micrótomo foi ajustado para corte na espessura de 5 micrómetros e a fita contendo a amostra foi fixada na lâmina utilizando albumina 10%. Finalmente, para concluir o preparo das lâminas para análise, foi realizada a bateria de coloração. Primeiramente as lâminas foram posicionadas no suporte de coloração, e mapeadas conforme sua localização no suporte, para posterior identificação, que inevitavelmente é apagada durante o processo de coloração.

Ao finalizar a bateria de coloração, que utiliza concentrações variadas de imersão em álcool e xilol, as lâminas foram retiradas uma a uma e identificadas novamente conforme o mapeamento prévio. A lamínula foi posicionada sobre as amostras, com adição de uma gota do meio de montagem *Permount* (Fisher Scientific®). O preparo das lâminas e sua coloração foram realizadas no laboratório de biologia celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. A análise das lâminas foi realizada pelo Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Paraná, através de microscopia óptica.

#### 2.2.2.7. Testes de comportamento animal

Dois testes comportamentais foram realizados com cada um dos animais dos 6 grupos pertencentes ao estudo. Primeiramente, na terceira semana de experimento foi realizado o teste para avaliação do comportamento tipo ansioso através do teste do labirinto elevado em cruz, segundo metodologia de Walf e Frye (2007). Foi utilizado um aparato de madeira e fórmica, dois braços abertos (50cm x 10cm), dois braços fechados (50cm x 10cm x 40cm), com uma área de junção central (10cm x 10cm) e suspenso a 50cm do chão. O rato foi colocado na junção dos braços, de frente para o braço fechado e foram contabilizados 5 minutos para exploração do aparato, enquanto eram feitas as filmagens para posterior contabilização do tempo de permanência em cada um dos

braços abertos e fechados. Foi considerada a entrada do animal em um dos braços quando as quatro patas encontravam-se dentro do braço e a saída, quando duas das patas foram retiradas do braço. Entre cada sessão o aparato foi limpo com álcool 10% para remoção de possíveis odores.

Na semana seguinte, última semana de experimento, o teste de campo aberto foi realizado. A duração, assim como no teste anterior, também foi de 5 minutos, tempo pelo qual o animal permaneceu sobre o aparato de madeira circular, com paredes de acrílico brancas. Cada rato foi colocado no centro do aparato e durante o período de tempo em que permaneceu em seu interior foram registradas as seguintes variáveis: tempo gasto na zona central; tempo gasto na zona periférica e o número de entradas em ambas as áreas que são delimitadas no piso do aparato com linhas pretas. Entre cada sessão, foi feita higienização do aparato com álcool 10% e todo o teste foi filmado para análise posterior ao momento do teste (MATHEUS et al., 2016).

#### 2.2.2.8. Análise estatística

O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para as análises estatísticas deste estudo. Os resultados foram avaliados pelo teste de análise de variância (ANOVA) com comparação de médias através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para os resultados experimentais de monitoramento semanal de peso e glicemia, foi realizado o teste ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Nos testes de comportamento do animais o teste Kruskal-Wallis, seguido de Dunn foram adotados ( $p < 0,05$ ). Os dados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante foram analisados pelo teste T de Student ( $p < 0,05$ ). O teste de correlação de Person foi utilizado para correlação entre os resultados obtidos nas análises de determinação de fenólicos totais e ABTS ( $p < 0,05$ ). O método estatístico Probitos foi adotado para os resultados de toxicidade preliminar, a partir da determinação dos valores da dose média letal ( $DL_{50}$ ), com 95% de intervalo de confiança.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O dimensionamento da amostra coletada foi realizado com 25 unidades dos frutos, escolhidas aleatoriamente no momento da higienização. A média de peso das 25 unidades foi de 79,3 g  $\pm$  23,14 (TABELA 1). O diâmetro máximo, que corresponde a maior medida entre as extremidades do fruto, no sentido horizontal, teve uma média de 5,42cm, enquanto o diâmetro mínimo, menor medida entre as mesmas extremidades, foi de 4,12 cm, apresentando portanto, a média de 4,77 cm entre esses valores. A altura, distância entre as extremidades do fruto no sentido vertical, foi de 5,43 cm.

Sereno et al. (2018), em estudo com o maná-cubiu também cultivado no litoral do estado do Paraná, caracterizou o dimensionamento dos frutos utilizados em seu estudo para determinação de carotenoides e minerais. Os autores encontraram diâmetro mínimo de 4,95 cm e máximo de 6,04 cm, com média de 5,49 cm. Resultados próximos aos encontrados neste estudo.

TABELA 1 - DIMENSIONAMENTO DA AMOSTRA

<b>Dimensionamento</b>	<b>Média e DP*</b>
Peso (g)	79,30 $\pm$ 23,14
Diâmetro máx (cm)	5,42 $\pm$ 0,63
Diâmetro min (cm)	4,12 $\pm$ 0,51
Média diâmetro (cm)	4,77 $\pm$ 0,54
Altura (cm)	5,43 $\pm$ 0,56

\*Valores obtidos a partir de 25 amostras e representados como média  $\pm$  desvio padrão.

#### 3.2. INTENSIDADE DE OCORRÊNCIA DE DEFEITOS

As mesmas 25 unidades de frutos, utilizadas para caracterização da amostra conforme rendimento foram analisadas segundo a intensidade de ocorrência de defeitos. Os defeitos apresentados pela amostra foram: manchas, amassados e sinais de apodrecimento. Os frutos amassados podem ter sofrido choque mecânico durante o

transporte ou acondicionamento nas caixas, já as manchas e sinais de apodrecimento, são defeitos naturalmente esperados em frutos pelo processo de deterioração. Não foram encontradas deformações em nenhuma das 25 unidades dos frutos (TABELA 2).

TABELA 2 - INTENSIDADE DE OCORRÊNCIA DE DEFEITOS

Ocorrência de defeitos	Número de frutos	Porcentagem*
Manchas	2	8%
Deformações	0	0%
Amassados	3	12%
Apodrecimento	2	8%
Total	7	28%

\*Valores obtidos a partir de 25 amostras e representados em número total e porcentagem.

### 3.3. RENDIMENTO

O rendimento de cada parte do fruto foi calculado conforme a quantidade total de frutos coletada, ou seja, 25kg. Após o descascamento manual e separação da semente, foram pesadas as partes (polpa; casca; polpa com casca, porção dos frutos que não passou pelo descascamento; semente; e resíduo, composto de pedúnculo e partes com avarias). O peso de cada fração foi categorizado segundo estágio de maturação, classificado conforme a coloração da casca (FIGURA 5). No GRÁFICO 1 é possível verificar que aproximadamente 6% do peso dos frutos era constituído por resíduos. Se considerarmos a porção de polpa com casca, seguindo a quantidade média de polpa e casca, separadamente das frações contabilizadas, obtém-se o rendimento total de 14% de cascas e 43% de polpa, para a mesma quantidade de semente (43%), compondo as proporções de um fruto inteiro, segundo as características de rendimento para esta amostra.

Em estudo com o mesmo fruto, outros autores encontram rendimentos de 3, 11 e 86% para o pedúnculo, casca e polpa, respectivamente (SERENO et al. 2018).

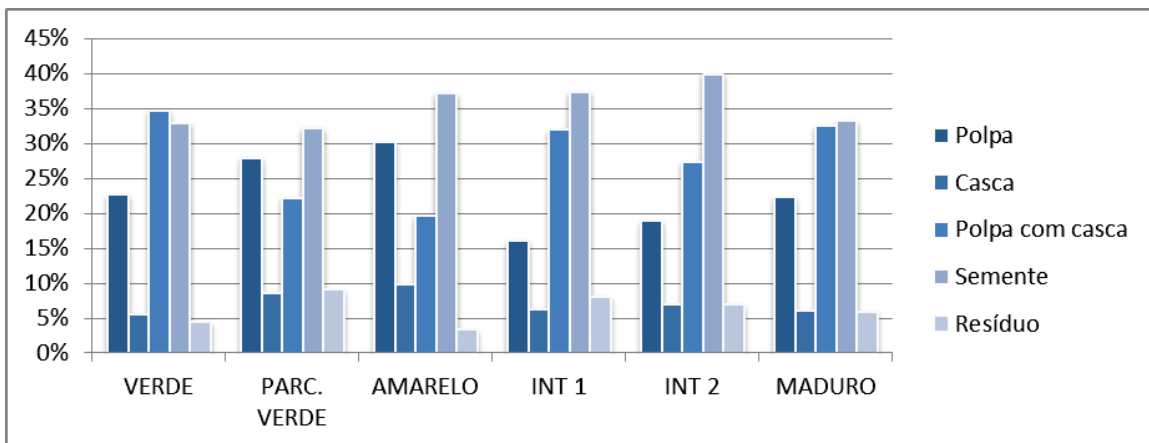
FIGURA 5 – ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO DO MANÁ-CUBIU



Legenda: Maná-cubiu em seus diferentes estádios de maturação. Da esquerda para direita: Fruto verde, parcialmente verde, amarelo, intermediário 1, intermediário 2 e maduro.

FONTE: A autora, 2018.

GRÁFICO 1 - RENDIMENTO POR PARTES DO FRUTO IN NATURA SEGUNDO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO



Legenda: Resultados expressos em porcentagem. Estádios de maturação: Fruto verde, Parcialmente verde (Parc. Verde), Amarelo, Intermediário 1 (INT1), Intermediário 2 (INT2) e maduro.

FONTE: A autora, 2018.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas foram similares aos já encontrados por outros autores. Neste estudo, os resultados variaram para as diferentes frações, sendo a fração da semente a que apresentou maior teor de lipídeos, 2,6g, conforme apresentado na TABELA 3. Na determinação de lipídeos no estudo de Yuyama (2007), valores entre 0,3 a 1,8g foram encontrados. O teor proteico também foi maior para a fração da semente, com o valor de 1,09g de proteínas em 100g de fruto, Lopes (2006) e Vieira (2010), encontraram valores de 0,82g e 0,81g respectivamente, em análise do fruto inteiro. Neste caso, a média das partes encontradas nas três frações analisadas separadamente foi de 0,77g, considerando que a porção menos proteica do fruto, a polpa, reduz este teor ao ser incluída na amostra representativa do fruto inteiro.

O pH encontrado, variando de 3,16 a 4,71, contribui para a característica de sabor encontrado no fruto, com certa adstringência e acidez específicas, assim como o teor determinado de açúcares, relativamente baixos por se tratar de um fruto em estágio de maturação intermediário, próximo ao maduro. Em comparação a determinação realizada por Pires (2006), o resultado obtido para pH foi igual a 4,12, porém os resultados do mesmo estudo para açúcares foi de 4,66g, quase o dobro do encontrado para a fração com maior valor neste estudo, 2,46g.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MANÁ-CUBIU

Análise	Polpa	Casca	Semente
Acidez	1,40 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,57 <sup>c</sup>	2,96 ± 0,02 <sup>a</sup>
pH	4,6	4,71	3,16
Proteínas (g/100g)	0,47 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,75 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,09 ± 0,37 <sup>a</sup>
Lipídeos (g/100g)	1,03 ± 0,18 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,34 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,47 <sup>a</sup>
Umidade (%)	6,42 ± 0,04 <sup>b</sup>	12,12 ± 0,40 <sup>a</sup>	11,71 ± 0,28 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	0,10 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,006 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,007 <sup>a</sup>
Açúcares Totais (g/100g)	0,49 ± 0,002 <sup>ab</sup>	2,47 ± 0,007 <sup>b</sup>	2,46 ± 0,008 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA (p<0,05).



### 3.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

#### 3.5.1. Capacidade de redução do radical DPPH

Para a avaliação dos resultados da análise da atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH, primeiramente foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH, para que fosse possível realizar o cálculo do CE<sub>50</sub> (concentração efetiva para redução de 50% do radical DPPH), através de regressão linear. Após, realizou-se comparação das amostras com os padrões utilizados: vitamina C e rutina.

Os resultados de CE<sub>50</sub> estão representados na TABELA 4. Os GRÁFICOS 2 e 3 apresentam os pontos das concentrações realizadas para cada amostra e controles, com sua respectiva porcentagem de atividade antioxidante do radical DPPH.

A fração do extrato bruto da casca (67,41 µg/mL) foi a amostra que mais se aproximou dos padrões, apresentando uma atividade antioxidante superior quando comparada à polpa do fruto. A menor concentração efetiva para redução de 50% do radical, indica maior atividade antioxidante, uma vez que a amostra analisada em menor concentração já apresenta boa capacidade em reduzir o radical pela metade. Assim, quanto menor o CE<sub>50</sub>, maior capacidade antioxidante das amostras. Mascato e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico a 70% do maná-cubiu por este método e obtiveram o valor de 606,3 µg/mL referente a concentração efetiva de 50% de redução do DPPH em análise do fruto inteiro. No presente estudo, foi possível verificar o potencial antioxidante da casca de forma isolada, que se comparada ao resultado obtido pelos autores para o fruto inteiro, mostra-se de grande importância.

Gonçalves et al. (2013) em estudo com extrato aquoso de maná-cubiu obteve o valor de CE<sub>50</sub> de 65,12 µg/mL, valor semelhante ao encontrado neste estudo para o extrato etanólico da casca. Segundo estes autores, a atividade antioxidante do maná-cubiu pode ser comprometida pelo elevado teor de ferro em sua composição, sendo notoriamente inferior se comparado aos padrões. Outra observação pertinente, é de que os extratos não são substâncias isoladas como são os padrões, vitamina C e rutina.

Barros et al. (2010) encontraram CE<sub>50</sub> de 447,92 µg/mL em ensaio de DPPH para análise do morango e 597,50 µg/mL para *blueberry*. Tanto o morango, quanto *blueberry*,

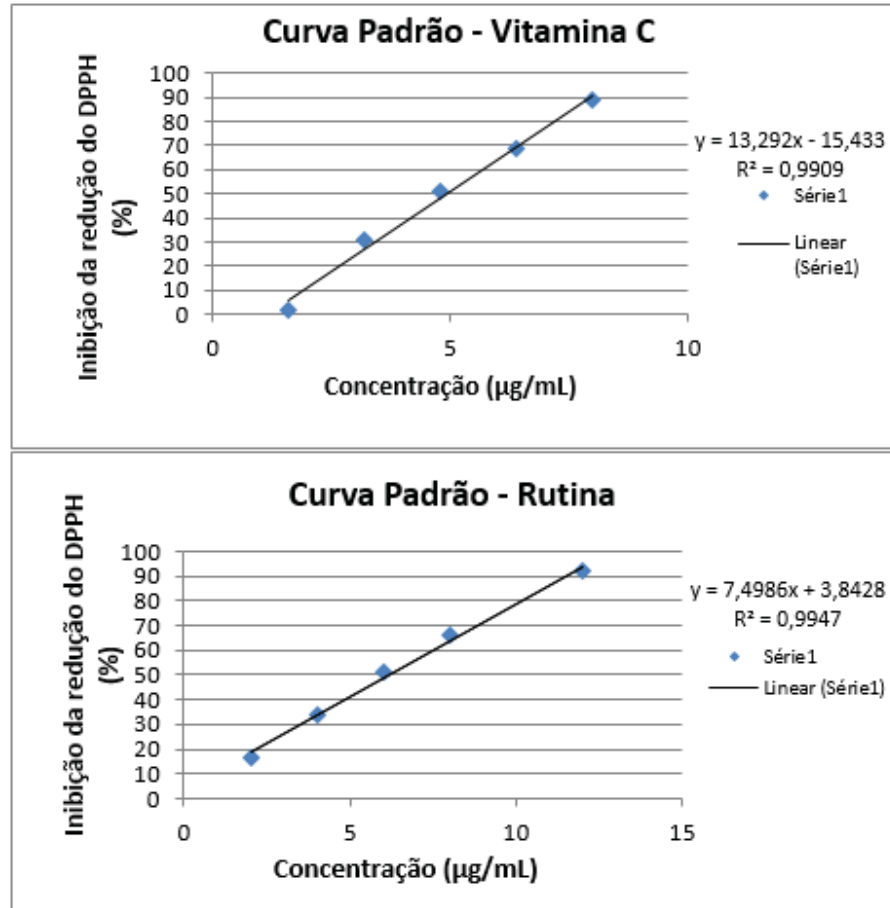
são frutos de coloração avermelhada, conhecidamente antioxidantes. Comparando com os resultados obtidos para o maná-cubiu, é possível notar que a casca mais uma vez se destaca pelo forte potencial antioxidante que apresentou, já que os valores encontrados pelos autores são mais próximos aos obtidos para a fração da polpa e muito mais elevados que os encontrados para a casca.

TABELA 4 - CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE MANÁ-CUBIU PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EXPRESSOS PELA CONCENTRAÇÃO EFETIVA EM 50% (CE50).

AMOSTRA	CE <sub>50</sub> (µg/mL) ± DP
VITAMINA C	4,92 ± 0,06 <sup>a</sup>
RUTINA	7,18 ± 0,07 <sup>a</sup>
CASCA	67,41 ± 2,99 <sup>b</sup>
POLPA COM SEMENTE	496,96 ± 11,86 <sup>c</sup>

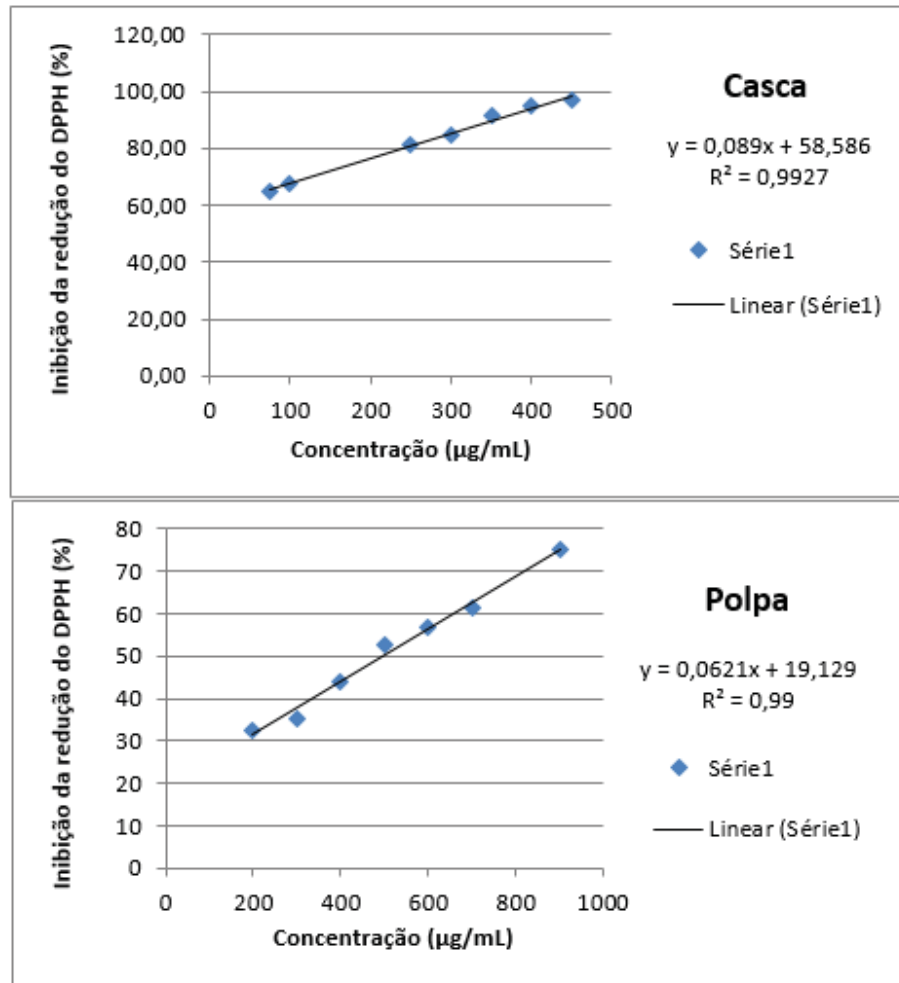
Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey (p<0,05).

GRÁFICO 2 – CURVAS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH DOS PADRÕES VITAMINA C E RUTINA



FONTE: A autora, 2018.

GRÁFICO 3 – CURVAS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE MANÁ-CUBIU DA CASCA E POLPA



FONTE: A autora, 2018.

### 3.5.2. Atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio

A atividade antioxidante de cada fração das amostras dos diferentes extratos foi calculada em relação aos padrões vitamina C, BHT e rutina, os quais apresentam o valor de 100% em relação às amostras. Os resultados encontrados são apresentados na TABELA 5. A partir dos resultados obtidos do extrato bruto das frações do maná-cubiu, é possível observar que todas as amostras apresentam atividade antioxidante pelo método de redução do complexo do fosfomolibdênio, porém, sem que houvesse diferença estatística entre a casca e a polpa, evidenciando uma atividade semelhante entre ambas as frações do fruto nesta análise.

TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

Amostra	AA em relação à Vitamina c AA(%) ± DP	AA em relação ao BHT AA(%) ± DP	AA em relação à Rutina AA(%) ± DP
VITAMINA C	100 <sup>a</sup>	-	-
BHT	-	100 <sup>a</sup>	-
RUTINA	-	-	100 <sup>a</sup>
CASCA BRUTO	10,27±0,56 <sup>b</sup>	25,57±1,09 <sup>b</sup>	35,94±1,53 <sup>b</sup>
POLPA BRUTO	12,70±2,82 <sup>b</sup>	45,33±10,07 <sup>c</sup>	51,43±11,43 <sup>b</sup>

Legenda: Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ), segundo teste de variância Anova seguida de Tukey.

### 3.5.3. Atividade antioxidante pelo método ABTS

Na análise de atividade antioxidante segundo metodologia de ABTS, os resultados apresentados na TABELA 6 demonstram que a casca possui atividade antioxidante maior do que as demais porções do fruto, polpa e semente, sendo esta última a que apresentou menor atividade. Ao compararmos estes resultados àqueles obtidos na determinação de fenólicos totais (TABELA 7), também foi a casca, a fração com maior teor destes compostos. No entanto, não é possível afirmar que a atividade antioxidante encontrada na análise de ABTS refere-se ao teor de fenólicos totais, pois outros compostos também podem apresentar tal atividade. Partindo deste princípio,

destaca-se que a semente apesar de apresentar maior teor de fenólicos totais, resultou em uma menor atividade antioxidante pela metodologia ABTS em comparação à polpa.

Cataneo et al. (2008) em estudo com resíduo industrial de uva tipo Couderc 13, avaliou a atividade antioxidante pelo método ABTS, encontrando o valor de 80,96  $\mu\text{M}$  Trolox/g em sua análise. Este achado, segundo os autores, indicam que este resíduo proveniente de vinícolas é um produto com capacidade antioxidante significativa, estando correlacionado ao teor de compostos fenólicos do fruto. Como a casca do maná-cubiu apresentou resultados ainda maiores aos encontrados por Cataneo e seus colaboradores nesta mesma análise, é possível destacar o forte potencial de aproveitamento e consumo do maná-cubiu com esta finalidade.

O bagaço da maçã Gala em base seca, analisado por Soares (2008), também apresentou resultados inferiores aos do maná-cubiu, com uma atividade antioxidante equivalente a 25,46  $\mu\text{M}$  Trolox/g, ou seja, valor 3,8 vezes menor que o valor encontrado neste estudo para a casca. Os valores de 31 e 29  $\mu\text{M}$  Trolox/g foram os resultados encontrados em estudo realizado com physalis (ROCKENBACH et al, 2008), relativamente próximos ao primeiro autor e também inferiores aos encontrados neste estudo.

TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS	
Fração do fruto	ABTS ( $\mu\text{M}$ Trolox/g)
Polpa	39,63 $\pm$ 0,79 <sup>b</sup>
Casca	97,44 $\pm$ 10,03 <sup>a</sup>
Semente	9,48 $\pm$ 0,61 <sup>c</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ).

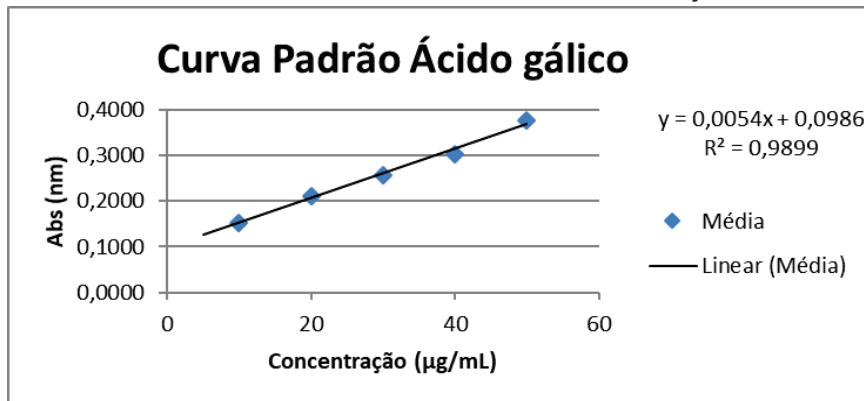
#### 3.5.4 Determinação de Fenólicos totais

A casca do maná-cubiu foi a porção do fruto com maior concentração de fenólicos totais quantificada neste estudo (TABELA 7), utilizando o ácido gálico como padrão (GRÁFICO 4).

Na TABELA 8, é expressa a correlação entre atividade antioxidante por ABTS e determinação de fenólicos totais segundo análise estatística por Pearson Spearman,

demonstrando que a presença de fenólicos totais está significativamente relacionada a atividade antioxidante por esta metodologia.

GRÁFICO 4 – CURVA PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS



FONTE: A autora, 2018.

TABELA 7- TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO MANÁ-CUBIU

Fração do fruto	Fenólicos totais (mg/ml)
Polpa	107,05 ± 42,5 <sup>a</sup>
Casca	412,36 ± 61,6 <sup>c</sup>
Semente	178,65 ± 47,5 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ).

TABELA 8- CORRELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS E DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

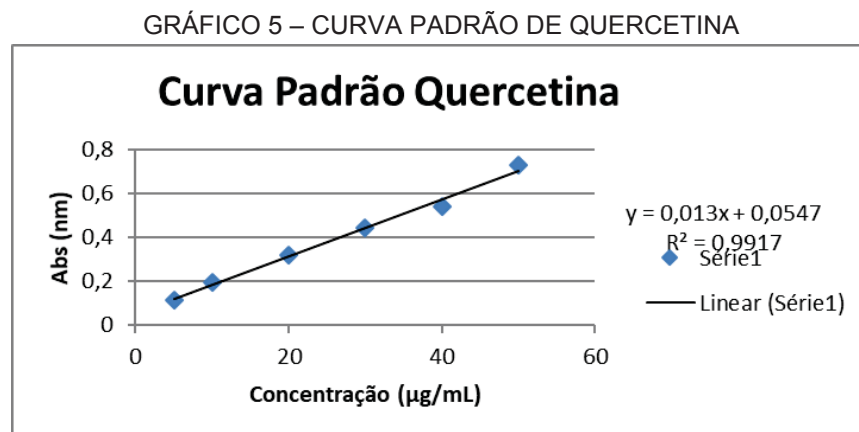
	Fenólicos	ABTS
Fenólicos	1	0,741*
ABTS	0,741*	1

Legenda: Teste estatístico de correlação de Pearson Spearman.

### 3.5.5. Determinação de Flavonoides totais

A curva padrão de quercetina para determinação de flavonoides totais está apresentada no GRÁFICO 5. A casca do fruto apresentou maior teor de flavonoides quando comparada à polpa (99,69 e 80,25 µg de quercetina/100mL, respectivamente), resultados expressos na TABELA 9.

Segundo Perez-vizcaino e Fraga (2018), pesquisas com flavonoides tem se mostrado promissoras nas últimas décadas, principalmente quando com objetivo de investigação da capacidade antioxidante. Segundo os autores, pesquisas mais tradicionais de meados de 1990, eram realizadas relacionando este aspecto com vitamina E, vitamina C e selênio, por exemplo. Tornando, atualmente, flavonoides e outros polifenóis novos promotores de saúde.



FONTE: A autora, 2018.

TABELA 9- TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS DO MANÁ-CUBIU	
AMOSTRA	Flavonóides totais (µg de quercetina/100mL de amostra)± DP
CASCA BRUTO	99,69 ± 11,35 <sup>a</sup>
POLPA BRUTO	80,25 ± 3,86 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ).



### 3.6. TOXICIDADE PRELIMINAR

Segundo Meyer et al. (1982), a estimativa da toxicidade utilizando *Artemia Salina*, microcrustáceo de água salgada, além de ser um método frequentemente empregado por ser de baixo custo e de simples realização, tem como objetivo determinar a concentração média letal (DL<sub>50</sub>) necessária do extrato ou solução avaliada em matar os microcrustáceos em suas variadas concentrações, demonstrando o potencial de toxicidade.

Os extratos brutos da polpa e da casca do maná-cubiu foram testados segundo esta metodologia, antes de serem utilizados na etapa de experimentação com animais. Além das amostras, o teste também foi realizado com o solvente metanol, utilizado para solubilizar as amostras, que não apresentou influência sobre os microcrustáceos.

Para uma amostra ser considerada tóxica segundo este método, é necessário que os resultados sejam inferiores a 1000µg/mL. Sendo assim, nenhum dos extratos testados foi considerado tóxico (TABELA 10), porque apresentaram DL<sub>50</sub> superior a 1000µg/mL.

Em conclusão ao estudo realizado por Hernandez et al. (2014), o maná-cubiu também não apresentou citotoxicidade para células da medula óssea, assim como não teve efeitos genotóxicos em ratos Wistar, sugerindo sua segurança para o consumo humano. Os autores ainda referem este achado à capacidade antioxidante do fruto, que pode contribuir para tais efeitos.

TABELA 10 – ENSAIO DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* e DL<sub>50</sub>

AMOSTRA	MORTALIDADE CONCENTRAÇÃO (µg/mL)				DL <sub>50</sub> (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
	10	100	500	1000		
CASCA BRUTO	1	0	1	1	>1000	-
POLPA BRUTO	0	1	3	2	>1000	-
METANOL	0	0	0	0	>1000	-

Legenda: Resultados expressos em número de obtidos por concentração de extratos (µg/mL)

### 3.7. EFEITO HIPOGLICEMIANTE *in vivo*

#### 3.7.1. ESTUDO PILOTO

O estudo piloto do experimento conduzido com 18 animais foi realizado em menor escala em comparação ao experimento final (com 36 animais) e 3 meses antes. Os animais da etapa piloto foram mantidos sob as mesmas condições e atenderam aos mesmos critérios de seleção para o estudo dos animais da etapa subsequente.

##### 3.7.1.1. Peso dos tecidos dos animais

Ao final do experimento, no momento da eutanásia, os órgãos foram retirados e pesados separadamente para comparação entre os grupos experimentais. De modo geral, o menor peso para o fígado dos animais, foi referente ao grupo intervenção que recebeu a casca do fruto (C20), enquanto que os maiores valores médios entre os pesos do coração e pulmão foram do grupo controle saudável (CS), conforme TABELA 11. O grupo CS também apresentou maior peso médio para o pâncreas, com aproximadamente 10g a mais que todos os demais grupos do experimento. Esta observação foi descrita por Wang et al. (2017), no estudo em que avaliaram as alterações histológicas do pâncreas e a redução de seu tamanho em camundongos com diabetes induzida com estreptozotocina.

No caso da aferição de peso dos rins, o valor apresentado na tabela, é referente à média dos dois rins de cada animal para compor a média do grupo, sem que tenha havido grande variação entre eles. Para todos os tecidos avaliados, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, controles e intervenção.

O peso dos órgãos dos animais pode ser um indicador seguro de algumas alterações fisiológicas, no caso de ratos diabéticos, existe um tendência ao aumento do peso dos rins. O rim é um órgão que não necessita de insulina para captação de glicose, o que gera maior acúmulo de glicogênio e conseqüentemente, hipertrofia renal (CINTRA et al., 2017). O maior valor encontrado para este órgão neste estudo foi para o grupo DM ( $1,22\text{g} \pm 0,02$ ). Entre os grupos tratados, o grupo C20 foi o que apresentou menor peso para este tecido.

TABELA 11 – PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS NO ESTUDO PILOTO (g)

	Fígado	Pâncreas	Rim	Coração	Pulmão	Baço
CS	9,92±0,17 <sup>a</sup>	0,57±0,26 <sup>a</sup>	1,18±0,07 <sup>a</sup>	1,20±0,05 <sup>a</sup>	1,81±0,18 <sup>a</sup>	0,74±0,05 <sup>a</sup>
DM	9,96±1,98	0,47±0,09	1,22±0,02	0,99±0,14	1,35±0,12	0,25±0,00
I100	9,38±1,29	0,48±0,04	1,18±0,15	0,83±0,03	1,42±0,14	0,42±0,17
I200	9,31±,99	0,49±0,08	1,21±0,16	0,79±0,09	1,25±0,15	0,38±0,07
P100	8,75±1,88	0,47±0,12	1,21±0,21	0,79±0,10	1,36±0,18	0,57±0,29
C20	7,84±0,65	0,47±0,08	1,10±0,06	0,73±0,21	1,28±0,09	0,41±0,12

Legenda: Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.1.2. Monitoramento semanal de peso corporal

No dia de chegada dos animais ao laboratório de nutrição experimental, aos 60 dias de vida, o peso médio dos 18 animais era de aproximadamente 245g. Durante a primeira semana de ambientação, todos os grupos ganharam peso, assim como na segunda semana, com exceção do grupo P100, o qual reduziu 8g de peso na média do grupo. O CS foi o único grupo que manteve o ganho de peso constante até o final do experimento. Enquanto que os demais grupos apresentarem oscilações nas semanas em que decorreu o estudo. Os dados do monitoramento do peso dos animais ao longo do experimento estão dispostos na TABELA 12.

Animais diabéticos apresentaram perda de peso após a indução da doença em estudo de Lerco et al. (2003). Durante o seguimento do estudo, os animais diabéticos apresentaram ganho de peso significativamente menor de peso em relação aos ratos saudáveis, com declínio progressivo da curva ponderal próximo ao final do experimento. Além disso, os autores ainda observaram alterações da pelagem, aumento da circunferência abdominal, devido ao intestino grosso distendido e palpável e presença de catarata em ambos os olhos dos animais diabéticos. Neste estudo, as características observacionais citadas pelos autores de distensão intestinal e alterações da pelagem também foram observadas, principalmente nos animais pertencentes ao grupo controle diabético (DM) e com menor intensidade entres os grupos tratados no grupo C20, que recebeu o extrato da casca do maná-cubiu.

TABELA 12 – MONITORAMENTO DO PESO SEMANAL DURANTE O ESTUDO PILOTO (g)

	Peso inicial	Semana 1	Semana 2	Pré-indução	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
CS	228±0,4 <sup>b</sup>	259±6,6 <sup>b</sup>	285±4,3 <sup>b</sup>	312±9,2 <sup>b</sup>	333±11,4 <sup>b</sup>	346±16 <sup>b</sup>	358±18,5 <sup>b</sup>	374,30±21,1 <sup>b</sup>
DM	268±9,2 <sup>b</sup>	306±1,7 <sup>b</sup>	323±1,2 <sup>ab</sup>	324±6,8 <sup>b</sup>	246±34,2 <sup>a</sup>	255±8,2 <sup>a</sup>	245±10,9 <sup>a</sup>	258,14±71,4 <sup>a</sup>
I100	252±1,7 <sup>a</sup>	283±11,3 <sup>a</sup>	296±15,1 <sup>a</sup>	294±17,1 <sup>a</sup>	275±13,1 <sup>a</sup>	274±17,5 <sup>a</sup>	259±20,0 <sup>a</sup>	247,47±24,6 <sup>b</sup>
I200	245±1,5 <sup>a</sup>	283±5,1 <sup>a</sup>	302±14,7 <sup>a</sup>	210±21,7 <sup>a</sup>	290±20,6 <sup>ab</sup>	273±35,8 <sup>a</sup>	261±19,0 <sup>ad</sup>	249,77±25,4 <sup>a</sup>
P100	244±4,1 <sup>a</sup>	273±18,3 <sup>a</sup>	265±29,3 <sup>b</sup>	284±32,6 <sup>a</sup>	262±36,7 <sup>a</sup>	235±31,9 <sup>a</sup>	248±33,6 <sup>a</sup>	243,3±44,4 <sup>a</sup>
C20	235±2 <sup>a</sup>	256±3,5 <sup>b</sup>	285±29,3 <sup>a</sup>	257±8,1 <sup>b</sup>	236±14,7 <sup>a</sup>	227±16,5 <sup>a</sup>	210±20,4 <sup>ac</sup>	211,88±24,9 <sup>a</sup>

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.1.3. Monitoramento semanal de glicemia capilar

Na TABELA 13 estão apresentados os valores glicêmicos referentes ao acompanhamento semanal dos animais em todos os grupos experimentais. Também foram aferidas as glicemias no período pré-indução e após 72h da administração de estreptozotocina, a título de comparação com parâmetros de normalidade dos mesmos animais e para confirmação de diagnóstico do diabetes, respectivamente.

Como esperado, a glicemia capilar aferida previamente ao momento de indução do diabetes é similar entre todos os grupos. A partir da primeira semana de intervenção, foram percebidas diferenças significativas entre os demais grupos e o grupo CS.

Um fator limitante na avaliação deste parâmetro foi o limite de aferição do glicosímetro utilizado de 500mg/dL. Valores superiores a este não são detectados pelo aparelho e por este motivo são identificados como “>500” na tabela de resultados.

TABELA 13 – MONITORAMENTO DA GLICEMIA CAPILAR NO ESTUDO PILOTO (mg/dL)

	Pré-indução	72h	Semana 1	Semana 2	Semana 3
CS	61±4 <sup>a</sup>	70±11 <sup>a</sup>	80±6 <sup>a</sup>	66±13 <sup>a</sup>	82±28 <sup>a</sup>
DM	71±6 <sup>a</sup>	448±44 <sup>b</sup>	446±49 <sup>b</sup>	492±14 <sup>b</sup>	>500±0 <sup>b</sup>
I100	68±1 <sup>a</sup>	426±83 <sup>b</sup>	488±20 <sup>b</sup>	>500±0 <sup>b</sup>	414±75 <sup>b</sup>
I200	66±9 <sup>a</sup>	404±58 <sup>b</sup>	481±30 <sup>b</sup>	>500±0 <sup>b</sup>	>500±0 <sup>b</sup>
P100	64±6 <sup>a</sup>	492±14 <sup>b</sup>	421±93 <sup>b</sup>	448±85 <sup>b</sup>	479±36 <sup>b</sup>
C20	75±11,14 <sup>a</sup>	449±87,76 <sup>b</sup>	474±41,88 <sup>b</sup>	409±93,6 <sup>b</sup>	496±6,93 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.1.4. Exames bioquímicos

#### 3.7.1.4.1. Parâmetros bioquímicos relacionados à glicemia

Os valores séricos de hemoglobina glicada e glicose média estimada dos grupos (I100, I200, P100 e C20) diferiram estatisticamente em relação ao controle diabético (DM). A partir desse resultados pode-se atribuir o possível potencial hipoglicemiante do maná-cubiu em todas as frações do fruto. Destas, houve maior destaque para a casca (C20) e para o fruto inteiro (I100), conforme FIGURA 6.

Os valores glicêmicos em jejum avaliados referentes ao dia final do experimento apresentaram grande variação entre os animais dos mesmos grupos, como é o caso do grupo C20 e I100 (TABELA 14). Desta forma, o teste estatístico empregado não identificou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), entre o controle diabético e os grupos que receberam os extratos.

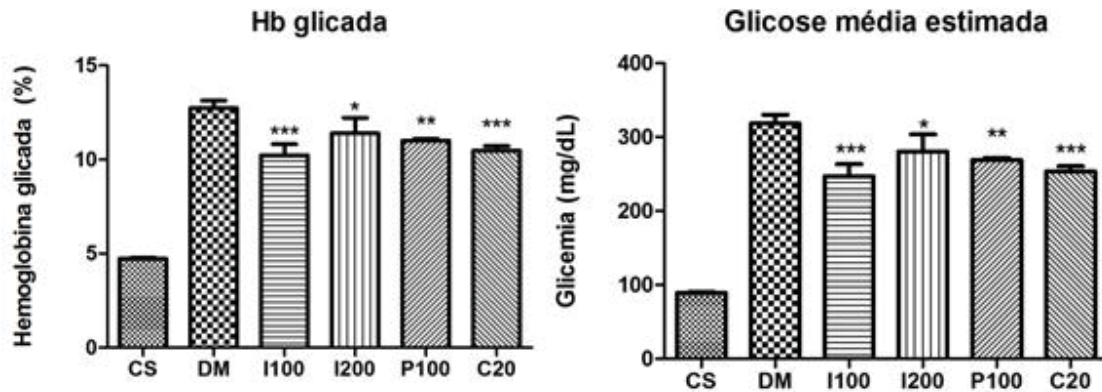
Outro aspecto importante a ser considerado é o de que a medicação utilizada para eutanásia, xilazina, pode promover efeito hiperglicemiante (LIMA; MALTA; LAMAS, 2001), apresentando o resultado observado inclusive para o grupo controle saudável, com média de 141 mg/dL, valor superior àquele estabelecido como referência para glicemia em roedores que é de 50 a 135 mg/dL (OLIVEIRA; NETO; ALMEIDA, 2016). Entretanto, mesmo que todos os grupos tenham recebido a mesma dose de xilazina (15mg/kg), observou-se a diferença estatística entre o CS e os demais grupos.

TABELA 14- EXAMES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS À GLICEMIA NO ESTUDO PILOTO

	CS	DM	I100	I200	P100	C20
GJ(mg/dL)	141±20,07 <sup>a</sup>	289,33±8,08 <sup>b</sup>	265,67±51,48 <sup>b</sup>	306,33±11,37 <sup>b</sup>	252±102,24 <sup>b</sup>	246,0±107,5 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Glicemia de jejum (GJ), Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (F100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (F1200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

FIGURA 6 - HEMOGLOBINA GLICADA E GLICOSE MÉDIA ESTIMADA NO ESTUDO PILOTO



Legenda: Diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  em relação ao controle diabético (DM);  $p < 0,001$ . Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (I100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (I200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

#### 3.7.1.4.2. Parâmetros bioquímicos relacionados ao perfil lipídico

O grupo intervenção que recebeu o extrato do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (200) foi o grupo com maior resultado para o exame de HDL colesterol, conforme apresentado na TABELA 15. Maia e colaboradores (2015) avaliam o efeito hipolipemiante do fruto, e em seus resultados observaram que o maná-cubiu foi capaz de elevar os níveis de HDL colesterol dos animais hiperlipidêmicos.

A maior média de colesterol total e de LDL colesterol entre os seis grupos experimentais, foi do grupo CS (90 mg/dL e 39,67 mg/dL, respectivamente). O CS também apresentou os maiores níveis de triglicerídeos séricos (125,0 mg/dL). Porém, não houve diferença estatística entre os grupos. Conseqüentemente, os valores de colesterol não-HDL e VLDL calculados a partir dos resultados obtidos para colesterol total e triglicerídeos, também foram superiores neste grupo controle.

Lerco et al. (2003) encontraram resultados similares nos exames bioquímicos relacionados ao perfil lipídico dos animais de seus grupos controles, saudável e diabético. Os autores avaliaram os níveis de colesterol total e triglicérides dos animais e os dois grupos apresentaram resultados muito próximos entre si. E assim como o observado neste estudo, o grupo saudável apresentou resultados superiores ao grupo diabético em algumas aferições. Foram observados ainda, valores médios do colesterol

HDL significativamente superior no grupo diabético em relação controle saudável, que segundo os autores, este achado poderia, eventualmente, conferir uma proteção ao desenvolvimento da doença aterosclerótica vascular em animais diabéticos, inversamente ao que se observa em humanos.

TABELA 15 – EXAMES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO PERFIL LIPÍDICO NO ESTUDO PILOTO

	CS	DM	I100	I200	P100	C20
CT	90,33±7,57 <sup>a</sup>	76±22,54,0 <sup>a</sup>	73,67±19,14 <sup>a</sup>	87,33±9,71 <sup>a</sup>	53,33±40,61 <sup>a</sup>	60,67±35,0 <sup>a</sup>
LDL	39,67±6,43 <sup>a</sup>	36,07±12,6 <sup>a</sup>	25,13±5,02 <sup>a</sup>	36,0±4,57 <sup>a</sup>	21,60±11,63 <sup>a</sup>	17,20±24,6 <sup>a</sup>
HDL	25,67±3,06 <sup>a</sup>	27,0±9,54 <sup>a</sup>	24,67±6,86 <sup>a</sup>	32,67±4,73 <sup>a</sup>	19,33±21,39 <sup>a</sup>	24,67±14,0 <sup>a</sup>
Não-HDL	64,67±9,02 <sup>a</sup>	49,0±13,08 <sup>a</sup>	49,0±15,72 <sup>a</sup>	54,67±6,11 <sup>a</sup>	34,0±19,29 <sup>a</sup>	36,00±29,6 <sup>a</sup>
VLDL	25,0±6,42 <sup>a</sup>	12,93±0,42 <sup>a</sup>	20,87±13,06 <sup>a</sup>	18,67±4,8 <sup>a</sup>	12,4±7,79 <sup>a</sup>	18,80±7,2 <sup>a</sup>
TG	125,0±32,0 <sup>a</sup>	64,67±2,08 <sup>a</sup>	119,33±65,3 <sup>a</sup>	93,33±24,0 <sup>a</sup>	62,0±38,97 <sup>a</sup>	94,00±36,0 <sup>a</sup>

Legenda: Resultados expressos em média (mg/dL) ± desvio padrão. Teste estatístico ANOVA seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Resultados sem diferença estatística. Colesterol total (CT), Triglicerídeos (TG). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

#### 3.7.1.4.3. Parâmetros bioquímicos relacionados à função renal e hepática

Os exames bioquímicos da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT) apresentaram valores superiores à 61 U/l, preconizado como valor máximo segundo a referência em todos os grupos tratados (I100, I200, P100 e C20) e o controle diabético (DM).

No caso da enzima aspartato aminotransferase (AST), os resultados dos grupos experimentais que receberam os extratos, mostraram-se superiores àqueles considerados como referência para ratos saudáveis (39 a 111 U/l), diferindo dos controles, tanto saudável quando diabético, conforme resultados da TABELA 16.

O limite máximo referenciado para creatinina (0,65 mg/dL) foi atingido e/ou ultrapassado por todos os grupos experimentais, se considerado os desvios padrão das médias.

O único exame bioquímico relacionado às funções hepática e renal que apresentou diferença estatística entre os grupos foi o de uréia. Sendo o CS o grupo com valor mais próximo ao recomendado e mais baixo entre os resultados obtidos.

TABELA 16- EXAMES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA NO ESTUDO PILOTO

	CS	DM	I100	I200	P100	C20
AST (U/l)	73,33±8,5 <sup>a</sup>	81,33±70,5 <sup>a</sup>	152,67±40,5 <sup>a</sup>	900±1319,85 <sup>a</sup>	392,33±557,6 <sup>a</sup>	152,33±74,45 <sup>a</sup>
ALT (U/l)	47±1,73 <sup>a</sup>	153±46,03 <sup>a</sup>	153,33±95,4 <sup>a</sup>	385,67±376,1 <sup>a</sup>	110±126,19 <sup>a</sup>	93,00±49,39 <sup>a</sup>
U (mg/dL)	44,67±5,13 <sup>a</sup>	136±15,87 <sup>b</sup>	146,67±75,1 <sup>b</sup>	131,33±25,38 <sup>b</sup>	127,33±24,95 <sup>b</sup>	123,33±27,65 <sup>b</sup>
Cr (mg/dL)	0,67±0,05 <sup>a</sup>	0,95±0,07 <sup>a</sup>	0,64±0,40 <sup>a</sup>	0,8±0,25 <sup>a</sup>	0,64±0,34 <sup>a</sup>	0,72±0,29 <sup>a</sup>
U/C	66,86±3,43 <sup>a</sup>	144,47±27,5 <sup>a</sup>	290,26±159,9 <sup>a</sup>	169,92±31,52 <sup>a</sup>	256,82±164,9 <sup>a</sup>	197,51±109,7 <sup>a</sup>

Legenda: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Uréia (U), Creatinina (Cr), Relação uréia/creatinina (U/C). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (F1100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (F1200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2. ETAPA EXPERIMENTAL

Na segunda e última etapa do experimento foram realizadas algumas alterações em relação à etapa piloto. A dose de estreptozotocina foi reduzida de 60 mg/kg para 50mg/kg, visto que na etapa anterior os animais apresentaram glicemias muito elevadas a ponto de o glicosímetro portátil não ser capaz de detectar, dificultando o controle semanal de glicemia capilar. Além disso, foi adotado jejum de 2 horas no período que antecedeu à gavagem, considerando as possíveis alterações de glicemias causadas pelo período pós-prandial dos animais, uma vez que recebiam alimento em livre demanda. A inclusão da curva glicêmica no vigésimo primeiro dia de experimento também foi uma das alterações para esta nova etapa, considerando que o extrato poderia apresentar um efeito glicêmico imediato após administração via gavagem. Por fim, o controle de consumo de alimento e água, através da pesagem da ração e avaliação do volume de água ingeridos, tornou-se mais um parâmetro de observação do estudo devido aos resultados discrepantes no ganho de peso dos animais diabéticos em relação ao controle saudável na primeira etapa do estudo, além da razão de que a polidipsia e polifagia serem sintomas clássicos do diabetes (GROSS et al., 2002). Além das análises de peroxidação lipídica e histopatológicas.



### 3.7.2.1. Peso dos tecidos dos animais

O grupo DM apresentou a maior média de peso referente ao coração. Esta tendência de aumento de peso cardíaco em ratos diabéticos em relação aos ratos normoglicêmicos foi descrita em estudo realizado por Cintra e seus colaboradores (2017). O grupo P100 foi aquele que mais se aproximou da média de peso cardíaco do grupo CS, sem que houvesse diferença estatística.

O grupo controle diabético (DM) foi aquele que apresentou maior peso aferido para o pâncreas, fígado, rim e coração. E o menor valor para o peso dos pulmões. Os grupos tratados com o fruto inteiro na dose de 200mg/kg (I200) e com a casca na dose de 20mg/kg (C20) foram o de maior e menor peso relacionado ao baço, respectivamente (TABELA 18).

Com relação ao pulmão, no presente estudo, o grupo CS foi o grupo com maior peso em ambas as etapas do estudo. A menor média do peso para o fígado foi do grupo controle saudável (CS), diferentemente do que foi observado no estudo piloto, com este valor para o grupo tratado com a casca.

Estatisticamente, o peso do fígado dos grupos P100 e C20 diferiram do controle diabético ( $p < 0,05$ ). No caso dos rins, os mesmos grupos também diferiram do controle diabético, com significâncias de 0,001 e 0,0001, do P100 e C20, respectivamente. Entre o controle diabético. O grupo C20 apresentou diferença entre o peso do pâncreas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo DM. Os demais tecidos (coração, pulmão e baço) não diferiram estatisticamente.

TABELA 17 – PESO DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS (g)

	Fígado	Pâncreas	Rim	Coração	Pulmão	Baço
CS	8,29±0,59 <sup>a</sup>	1,03±0,22 <sup>a</sup>	1,19±0,09 <sup>a</sup>	1,31±0,16 <sup>a</sup>	2,20±0,21 <sup>a</sup>	0,84±0,16 <sup>a</sup>
DM	12,72±0,96 <sup>b</sup>	1,17±0,41 <sup>ac</sup>	1,65±0,15 <sup>b</sup>	1,48±0,11 <sup>a</sup>	1,85±0,31 <sup>a</sup>	0,81±0,05 <sup>a</sup>
I100	11,75±0,84 <sup>b</sup>	0,82±0,38 <sup>a</sup>	1,51±0,08 <sup>b</sup>	1,42±0,15 <sup>a</sup>	2,09±0,06 <sup>a</sup>	0,80±0,10 <sup>a</sup>
I200	12,00±1,08 <sup>b</sup>	0,83±0,13 <sup>a</sup>	1,54±0,12 <sup>b</sup>	1,42±0,12 <sup>a</sup>	2,11±0,14 <sup>a</sup>	0,93±0,30 <sup>a</sup>
P100	10,99±0,78 <sup>c</sup>	0,82±0,16 <sup>a</sup>	1,43±0,09 <sup>c</sup>	1,38±0,39 <sup>a</sup>	1,90±0,12 <sup>a</sup>	0,80±0,11 <sup>a</sup>
C20	11,00±1,11 <sup>c</sup>	0,63±0,06 <sup>ab</sup>	1,40±0,14 <sup>c</sup>	1,43±0,28 <sup>a</sup>	2,11±0,37 <sup>a</sup>	0,67±0,19 <sup>a</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2.2. Monitoramento semanal de peso corporal

Os grupos experimentais tratados com os extratos do fruto inteiro nas doses de 100 e 200mg/kg (I100 e I200) e da casca na dose de 20mg/kg (C20), após a segunda semana de intervenção, mantiveram a média de peso. Já o grupo que recebeu extrato da polpa do fruto (P100) não apresentou perda de peso durante as semanas de seguimento após a primeira semana de indução do diabetes (TABELA 19). Este foi o único grupo que se diferenciou estatisticamente do grupo controle diabético ( $p < 0,05$ ), apenas na primeira semana após a indução.

O grupo controle saudável (CS) foi aquele que manteve o ganho de peso ao longo das semanas de estudo, enquanto que o grupo controle diabético (DM) ganhou peso na segunda semana de ambientação (peso aferido no momento da pré-indução do diabetes), tendo uma redução média de 15g na primeira semana, seguido de um ganho de apenas 3g na semana seguinte e novamente perda de aproximadamente 16g na terceira semana. Apenas na última semana este grupo apresentou ganho de peso maior que 20g.

De modo geral, todos os grupos que foram induzidos ao diabetes, exceto C20, perderam peso nesta primeira semana com a doença. Este fato pode ser explicado pelo efeito observado na rotina do laboratório, em que os animais dos grupos CS, DM, I100, I200 e P100 apresentaram grande perda de fluídos corporais com aumento significativo do volume de urina e fezes excretados.

Yuyama et al. (2005) observaram, em estudo sobre a influência da fibra do maná-cuniu sobre a glicemia dos animais, que mesmo não havendo diferença no consumo de ração entre os grupos avaliados, a perda de peso corporal dos animais diabéticos foi significativamente maior. O que, segundo os autores, pode ser explicado pela descompensação metabólica aguda ocasionada pelo processo catabólico acelerado de carboidratos, proteínas e lipídeos, aumentando a lipólise e a desidratação.

TABELA 18 – MONITORAMENTO DO PESO SEMANAL (g)

	Ambientação 1	Pré-indução	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
CS	200,7±1,6 <sup>a</sup>	236,6±7,9 <sup>a</sup>	256,5±7,4 <sup>a</sup>	264,2±10,2 <sup>a</sup>	284,3±15,5 <sup>a</sup>	284,1±15,9 <sup>a</sup>
DM	252,6±12,5 <sup>b</sup>	296,0±23,7 <sup>b</sup>	281,0±22,1 <sup>a</sup>	284,6±22,2 <sup>ac</sup>	268,2±21,3 <sup>ac</sup>	291,4±22,8 <sup>ac</sup>
I100	239,4±2,7 <sup>b</sup>	283,8±6,1 <sup>b</sup>	277,2±6,0 <sup>a</sup>	282,8±9,2 <sup>a</sup>	280,6±7,6 <sup>a</sup>	281,3±11,2 <sup>a</sup>
I200	229,1±3,5 <sup>b</sup>	277,7±16,2 <sup>b</sup>	269,1±12,1 <sup>a</sup>	272,0±15,1 <sup>a</sup>	274,9±10,7 <sup>a</sup>	271,3±16,5 <sup>a</sup>
P100	218,3±4,3 <sup>a</sup>	256,0±10,5 <sup>a</sup>	253,1±8,5 <sup>a</sup>	254,5±14,1 <sup>ab</sup>	260,4±13,5 <sup>ab</sup>	264,9±14,6 <sup>a</sup>
C20	201,3±13,99 <sup>a</sup>	258,6±19,83 <sup>a</sup>	259,6±21,81 <sup>a</sup>	264,9±26,0 <sup>a</sup>	263,1±33,1 <sup>a</sup>	264,6±36,6 <sup>ab</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2.3. Monitoramento semanal de glicemia capilar

Os grupos experimentais do estudo apresentaram resultados de glicemia capilar média similares entre si no período que antecedeu a indução do diabetes (TABELA 20). No teste estatístico empregado, os grupo tratados com o fruto inteiro nas duas doses testadas (I100 e I200) diferiram ( $p < 0,05$ ) do grupo tratado apenas com a polpa do fruto (P100) na primeira aferição glicêmica após a indução.

Yuyama e seus colaboradores (2005) também não encontraram diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado com a fibra do maná-cubiu ao longo das 3 primeiras semanas de experimento. Na quarta e última semana, o grupo tratado apresentou média de glicemia de 224mg/dL, enquanto que o grupo controle também diabético, apresentou média de glicemia de 351mg/dL. Este efeito foi justificado pela ação das fibras em reduzir a absorção de glicose pelo trato gastrointestinal.

TABELA 19 – MONITORAMENTO DA GLICEMIA CAPILAR (mg/dL)

	Pré-indução	72h	Semana 1	Semana 2	Semana 3
CS	49±5 <sup>a</sup>	77±7 <sup>a</sup>	61±6 <sup>a</sup>	73±13 <sup>a</sup>	68±11 <sup>a</sup>
DM	54±8 <sup>a</sup>	258±98 <sup>b</sup>	420±73 <sup>b</sup>	500±0 <sup>b</sup>	448±76 <sup>b</sup>
I100	54±7 <sup>a</sup>	310±26 <sup>b</sup>	451±60 <sup>b</sup>	394±93 <sup>b</sup>	437±54 <sup>b</sup>
I200	51±11 <sup>a</sup>	323±83 <sup>b</sup>	449±83 <sup>b</sup>	436±83 <sup>b</sup>	406±63 <sup>b</sup>
P100	46±6 <sup>a</sup>	436±75 <sup>bc</sup>	379±73 <sup>b</sup>	425±82 <sup>b</sup>	436±75 <sup>b</sup>
C20	51±4 <sup>a</sup>	383±112 <sup>bc</sup>	391±99 <sup>b</sup>	439±69 <sup>b</sup>	424±80 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2.4. Curva glicêmica

Para realização da curva glicêmica, utilizou-se o mesmo protocolo realizado em todos os 28 dias de experimento, em que os animais permaneceram em jejum durante 2h antes da realização da gavagem e aferição da glicemia. Os grupos controles, CS e DM, apresentaram diferentes respostas glicêmicas ao decorrer do tempo, considerando que ambos receberam apenas água pela gavagem. O controle saudável no momento 0, apresentou glicemia de 68 mg/dL (TABELA 21), quinze minutos após a gavagem, a glicemia subiu para 84 mg/dL e após trinta minutos, baixou para 77 mg/dL, mantendo-se com 76 mg/dL após 1h. No caso do controle DM, a glicemia aumentou após a gavagem e só reduziu após 1h. O grupo com melhor resposta glicêmica nesta análise foi aquele tratado com a casca do fruto, iniciando o teste com glicemia média do grupo igual a 424 mg/dL, com redução para 415, 413 e 403 mg/dL, nos tempos 15, 30 e 60 minutos, respectivamente.

TABELA 20- CURVA GLICÊMICA (mg/dL)

	0'	15'	30'	60'
CS	68±11 <sup>a</sup>	84±20 <sup>a</sup>	77±8 <sup>a</sup>	76±15 <sup>a</sup>
DM	448±76 <sup>b</sup>	458±64 <sup>b</sup>	478±34 <sup>b</sup>	453±57 <sup>b</sup>
I100	437±54 <sup>b</sup>	460±41 <sup>b</sup>	391±76 <sup>b</sup>	427±74 <sup>b</sup>
I200	406±63 <sup>b</sup>	417,2±78 <sup>b</sup>	453,6±43 <sup>b</sup>	447,2±65 <sup>b</sup>
P100	436±75 <sup>b</sup>	414±54 <sup>b</sup>	470±30 <sup>b</sup>	409±54 <sup>b</sup>
C20	424±80 <sup>b</sup>	415±81 <sup>b</sup>	413±81 <sup>b</sup>	403±86 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2.5. Controle de consumo alimentar e hídrico

O controle de ingestão de água e ração dos animais durante o experimento foi realizado em dois dias de cada uma das semanas em que eles permaneceram no laboratório de experimentação. A água e a ração foram oferecidas em livre demanda nos dias de monitoramento. Porém, foram anotados o peso da ração e volume de água antes e depois do período de oferta correspondente a 24h. Ao final do experimento, foi calculada a média do consumo do período todo para cada grupo.

O grupo que recebeu a casca de maná-cubiu consumiu uma quantidade de água e ração significativamente menor que o grupo controle diabético ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Assim como quando comparado aos demais grupos diabéticos que receberam extratos do fruto inteiro, com o consumo de ração significativamente menor ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0001$  para I200 e I100, respectivamente). O grupo tratado com casca também consumiu menor quantidade de água em comparação à I100 e I200, com significância de 95%.

O grupo diabético sem tratamento do estudo realizado por Lerco et al. (2003) apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupo de animais saudáveis ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, a ingestão hídrica e a diurese de animais diabéticos apresentaram valores significativamente elevados, quando comparadas com ratos normoglicêmicos.

TABELA 21- CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO

	Água (ml)	Ração (g)
CS	297,5±66,92 <sup>a</sup>	129,29±10,74 <sup>a</sup>
DM	872,5±58,98 <sup>b</sup>	253,75±7,78 <sup>b</sup>
I100	800±92,58 <sup>bc</sup>	241,92±22,59 <sup>bc</sup>
I200	812,5±145,7 <sup>bd</sup>	237,16±14,78 <sup>b</sup>
P100	685±171,8 <sup>c</sup>	214,25±18,81 <sup>c</sup>
C20	635±111,2 <sup>c</sup>	207,35±12,83 <sup>c</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2.6. Exames bioquímicos

#### 3.7.2.6.1. Parâmetros bioquímicos relacionados à glicemia

Assim como no desempenho do teste de curva glicêmica, o melhor grupo com resultados mais próximos ao CS nos resultados de hemoglobina glicada (HbA1c), foi o grupo que recebeu extrato da casca, com 8,63% (TABELA 23). Consequentemente, o grupo C20 foi o que apresentou a menor glicose média estimada, segundo a HbA1c, com a média de 201,3 mg/dL. Este achado contempla a sugestão feita por Yuyama et al. (2005) na conclusão do estudo realizado com a fibra de maná-cubiu. Os autores informam a necessidade de investigação dos seus resultados acerca da ação

hipoglicemiante, a fim de esclarecer se o efeito encontrado por eles é justificado pela presença da fibra do fruto ou pelos constituintes presentes nesta fração da casca do fruto.

A HbA1c permite avaliar a glicemia média de um período mais longo de tempo do que a glicemia, por isso é um critério de avaliação do perfil glicêmico mais fiel à realidade do indivíduo. Além disso, resultados recentes, afirmam que a correlação entre os níveis de HbA1c e triglicerídeos, mostrou ser o melhor marcador de resistência insulínica (RI) em pacientes obesos, independentemente dos marcadores de acúmulo de gordura (índice de massa corporal, circunferência da cintura, massa de gordura corporal) (BOURSIER et al., 2018).

TABELA 22- EXAMES BIOQUÍMICOS RELACIONADOS À GLICEMIA

	CS	DM	I100	I200	P100	C20
GJ(mg/dL)	141,1±21,7 <sup>a</sup>	444,5±100,1 <sup>b</sup>	351,1±135,2 <sup>b</sup>	465,3±120,3 <sup>b</sup>	450,0±212,2 <sup>b</sup>	489,5±227,4 <sup>b</sup>
HbA1c (%)	4,43±0,15 <sup>a</sup>	9,20±0,45 <sup>b</sup>	8,97±0,23 <sup>b</sup>	9,45±0,63 <sup>b</sup>	9,03±0,70 <sup>b</sup>	8,63±2,01 <sup>b</sup>
GM (mg/dL)	80,54±4,3 <sup>a</sup>	217,5±12,9 <sup>b</sup>	210,67±6,3 <sup>b</sup>	224,5±17,9 <sup>b</sup>	212,6±20,1 <sup>b</sup>	201,3±57,7 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20). Glicemia de jejum (GJ), Hemoglobina glicada (HbA1c), Glicemia média estimada (GM).

### 3.7.2.6.2. Parâmetros bioquímicos do perfil lipídico

Os maiores resultados para os exames bioquímicos de colesterol total, LDL, e não-HDL foram apresentados pelo grupo experimental C20. Sendo que apenas este último parâmetro diferiu estatisticamente do controle diabético ( $p < 0,001$ ). Apesar disso, os valores de HDL colesterol também foram os mais satisfatórios para este grupo.

Como o grupo com maior nível de HDL colesterol no estudo piloto também foi um grupo experimental tratado com o fruto, grupo I200 na primeira etapa, podemos considerar que o maná-cubiu apresenta possivelmente eleva os níveis deste tipo de colesterol, independente da fração do fruto. Maia e colaboradores (2015) publicaram resultados satisfatórios quando relacionam o fruto ao perfil lipídico. Neste caso, os autores ofertaram a farinha de maná-cubiu para animais hipercolesterolêmicos (e não diabéticos) e o fruto mostrou-se capaz de elevar HDL colesterol, reduzir as

concentrações de colesterol total e LDL colesterol, além de aumentar a excreção de colesterol pelas fezes.

Para o colesterol VLDL e triglicerídeos, os maiores resultados obtidos foram pelo grupo DM (TABELA 24), o que é compreensível, uma vez que os triglicerídeos estão relacionados ao metabolismo de carboidratos (BOURSIER et al., 2018). O grupo DM apresentou ainda o menor valor de LDL colesterol. Os animais do grupo CS apresentaram o menor valor para o parâmetro de colesterol total, corroborando com a afirmativa de Monteiro e Palma (2016) de que os pacientes diabéticos podem apresentar colesterol total mais elevado que indivíduos normoglicêmicos.

TABELA 23- EXAMES BIOQUÍMICOS DO PERFIL LIPÍDICO (mg/dL)

	CS	DM	I100	I200	P100	C20
CT	57±3,84 <sup>a</sup>	70±12,96 <sup>a</sup>	73,5±7,81 <sup>a</sup>	70±11,41 <sup>a</sup>	70±8,98 <sup>a</sup>	83±10,19 <sup>b</sup>
LDL	16,3±3,01 <sup>a</sup>	11,03±6,43 <sup>a</sup>	18,6±5,23 <sup>a</sup>	18,46±12,11 <sup>a</sup>	18,5±9,70 <sup>a</sup>	26,53±8,77 <sup>b</sup>
HDL	30,66±3,93 <sup>a</sup>	33,83±3,81 <sup>a</sup>	34,16±3,18 <sup>a</sup>	33,33±3,55 <sup>a</sup>	33,16±5,26 <sup>a</sup>	38,33±6,56 <sup>a</sup>
Não-HDL	26,33±4,67 <sup>a</sup>	36,16±10,57 <sup>a</sup>	39,33±7,39 <sup>a</sup>	36,66±9,85 <sup>a</sup>	36,83±9,32 <sup>a</sup>	44,66±4,96 <sup>b</sup>
VLDL	10,33±2,54 <sup>a</sup>	25,13±13,94 <sup>a</sup>	20,73±9,36 <sup>a</sup>	18,2±7,98 <sup>a</sup>	18,33±11,26 <sup>a</sup>	18,13±10,25 <sup>a</sup>
TG	50,16±12,73 <sup>a</sup>	125,66±69,74 <sup>a</sup>	103,66±46,83 <sup>a</sup>	91±39,90 <sup>a</sup>	91,66±56,33 <sup>a</sup>	90,66±51,25 <sup>a</sup>

Legenda: Resultados apresentados como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Colesterol total (CT), Triglicerídeos (TG). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.2.6.3. Parâmetros bioquímicos relacionados à função renal e hepática

A dosagem de enzimas séricas como AST e ALT são utilizadas para avaliação de distúrbios hepáticos, o aumento da atividade destas enzimas, pode significar uma disfunção hepática no caso de indivíduos diabéticos. A doença pode ocasionar o extravasamento dessas enzimas do citosol hepático para a corrente sanguínea (CHAHDOURA et al., 2017). Assim sendo, os grupos I100, I200 e P100 apresentaram valores benéficamente inferiores da enzima ALT em relação ao grupo DM ( $p < 0,05$ ). Para a enzima AST, apesar de não apresentar diferença estatística nos resultados obtidos, o P100 foi o grupo que apresentou a menor média para esta dosagem.

Chahdoura et al. (2017) compararam os resultados de exames bioquímicos de animais após 28 dias de indução da doença, o grupo controle saudável dos estudo dos

autores apresentaram valores da enzima AST de  $61,61 \pm 2,87$  e ALT,  $45,31 \pm 3,84$ . Paralelamente, o grupo controle diabético apresentou valores de  $141,00 \pm 6,11$  para a enzima AST e  $132,00 \pm 1,87$  para ALT.

A creatinina foi o exame bioquímico de função renal com menor variação entre todos os grupos experimentais. Enquanto que a uréia foi relativamente menor no controle saudável em comparação aos demais grupos, porém só apresentou diferença estatística em relação aos grupos I200 e C20.

TABELA 24- EXAMES BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA

	CS	DM	I100	I200	P100	C20
AST (U/l)	$107 \pm 36,70^a$	$95,16 \pm 37,32^a$	$107,33 \pm 12,42^a$	$90,16 \pm 13,60^a$	$89,16 \pm 29,44^a$	$123,5 \pm 42,15^a$
ALT (U/l)	$30 \pm 13,09^a$	$77,33 \pm 22,0^b$	$65,33 \pm 29,26^a$	$68 \pm 16,12^a$	$56,5 \pm 35,27^a$	$89 \pm 39,51^b$
U (mg/dL)	$47,67 \pm 5,82^a$	$74,83 \pm 10,85^a$	$72,67 \pm 16,40^a$	$94,50 \pm 20,31^b$	$72,17 \pm 26,87^a$	$95,50 \pm 44,93^b$
Cr (mg/dL)	$0,39 \pm 0,14^a$	$0,37 \pm 0,07^a$	$0,42 \pm 0,12^a$	$0,39 \pm 0,14^a$	$0,49 \pm 0,16^a$	$0,53 \pm 0,18^a$
U/C	$138,5 \pm 51,89^a$	$212,67 \pm 66,6^a$	$188,33 \pm 68,91^a$	$287,33 \pm 129,45^a$	$181,67 \pm 113,48^a$	$190,00 \pm 89,72^a$

Legenda: Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística segundo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey ( $p < 0,05$ ). Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Uréia (U), Creatinina (Cr), Relação uréia/creatinina (U/C). Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.7.4. Análises histopatológicas

#### 3.7.4.1. Análises histopatológicas do fígado

Os achados mais relevantes na análise histopatológica do fígado dos animais diabéticos não tratados (DM) foi o aumento do tamanho dos hepatócitos em todos os animais do grupo (FIGURA 7). Uma vez que estas células estão maiores, os espaços sinusoidais tornam-se diminuídos, assim, todos os animais do grupo DM apresentaram redução desta estrutura. Animais diabéticos, também induzidos por STZ, apresentaram perda de arquitetura hepática, dilatação de capilares sinusoidais hepáticos e células apoptóticas, além do aumento do tamanho dos hepatócitos e seus núcleos, em estudo com o uso da naringina na redução de lesão hepática (RODRÍGUEZ; PLAVNIK; TALAMONI, 2018).

A binucleação dos hepatócitos representa a regeneração hepatocelular e esteve presente em todos os animais do grupo DM (TABELA 26). Apenas 4 de 6 animais do CS



apresentaram binucleação celular, mesmo número de indivíduos do grupo I100. Com relação ao tamanho dos hepatócitos, opostamente ao observado no grupo DM, o CS apresentou normalidade em 100% dos animais. Todos os grupos tratados (I100, I200, P100 e C20) apresentaram normalidade em 50% ou mais dos indivíduos, demonstrando bom desempenho do fruto diante das alterações promovidas pelo diabetes induzido.

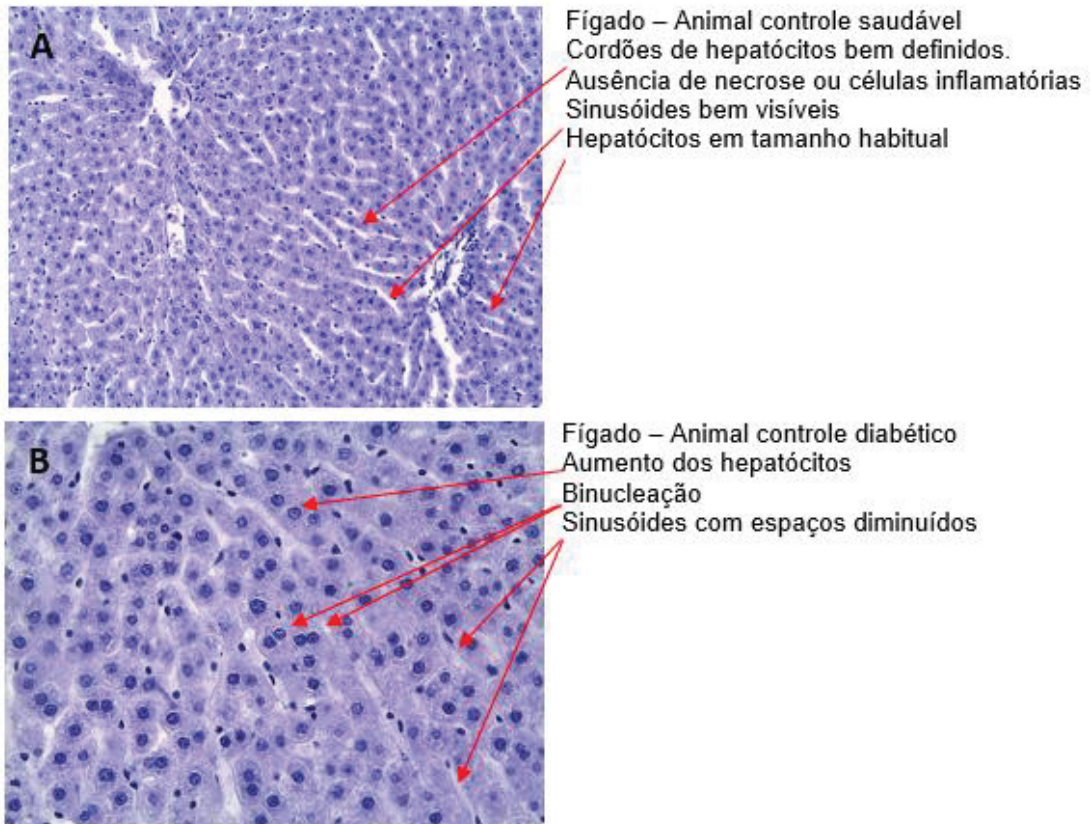
A arquitetura trabecular dos tecidos hepáticos de todos os grupos encontraram-se preservadas. Não foram observadas necrose nos hepatócitos, nem presença de células inflamatórias em nenhum dos grupos, como observamos em estudo com flores de Pfeiff, no qual os autores descrevem a presença de células necróticas com núcleos de focos necróticos reduzidos e condensados. Neste mesmo estudo, foi encontrado número aumentado de células Kupffer no parênquima hepático (CHAHDOURA et al., 2017).

TABELA 25 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

	Arquitetura laminar (trabecular)	Espaços sinusoidais	Células de Kupffer	Tamanho de hepatócitos	Binucleação	Necrose de hepatócitos
CS	Preservada 100%	Normal 100%	Normal 100%	Normal 100%	Ausente 66,6% Presente 33,3%	Ausente 100%
DM	Preservada 100%	Reduzido 100%	Normal 100%	Aumentado 100%	Presente 100%	Ausente 100%
I100	Preservada 100%	Normal 66,6% Reduzido 33,3%	Normal 100%	Normal 66,6% Aumentado 33,3%	Ausente 66,6% Presente 33,3%	Ausente 100%
I200	Preservada 100%	Normal 83,3% Reduzido 16,6%	Normal 100%	Normal 83,3% Aumentado 16,6%	Ausente 50% Presente 50%	Ausente 100%
P100	Preservada 100%	Normal 66,6% Reduzido 33,3%	Normal 100%	Normal 66,6% Aumentado 33,3%	Ausente 50% Presente 50%	Ausente 100%
C20	Preservada 100%	Normal 50% Reduzido 50%	Normal 100%	Normal 50% Aumentado 50%	Ausente 83,3% Presente 16,6%	Ausente 100%

Legenda: Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

FIGURA 7 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO EM COLORAÇÃO HE



Legenda: Fotomicrografias de fígado dos animais pertencente aos grupos Controle Saudável (A) e Diabético (B) com identificação das estruturas Fonte: A autora (2018).

#### 3.7.4.2. Análises histopatológicas do rim

O grupo C20 foi o grupo que apresentou ausência de dilatação do espaço urinário em todos os animais, assim como o grupo CS. Os demais grupos tratados I100, I200 e P100 apresentaram 50%, 80% e 83,3% dos indivíduos sem esta alteração glomerular, demonstrando um possível efeito protetor dos extratos sobre as características renais observadas em 100% dos animais diabéticos não tratados (DM) nesse mesmo aspecto. Se considerarmos os resultados Outra característica presente em todo o grupo DM foi a dilatação luminal dos túbulos renais e apenas este grupo apresentou esta alteração. Os animais tratados com os extratos de maná-cubiu não apresentaram dilatação, da mesma forma que o observado no CS.

A degeneração vacuolar do epitélio dos túbulos renais também foi ausente em pelo menos 50% dos animais de todos os grupos tratados com o fruto, mais uma vez diferenciando-os do grupo de animais diabéticos não tratados.

O achado mais relevante dentre as alterações histológicas do grupo DM foi a presença de células epiteliais tubulares com degeneração vacuolar (FIGURA 8), ou seja, as células se tornaram pálidas e de tamanho aumentado, associado à dilatação das luzes dos túbulos contornados. A congestão capilar dos glomérulos, edema do interstício e presença de células inflamatórias, não foram observadas em nenhum dos grupos analisados (TABELA 27).

Pesquisas tem demonstrado que o diabetes por si só é um fator de risco independente para lesão renal aguda, pelo desequilíbrio eletrolítico e alterações bioquímicas precoces, responsáveis pelas lesões celulares que levam à nefropatia em indivíduos diabéticos. Seções do rim diabético não tratado revelaram alterações glomerulares e intersticiais tubulares em comparação realizada à animais controle em estudo com cravo-da-índia e metformina. As lesões observadas pelos autores incluíram túbulos dilatados com espessamento da membrana basal dos glomérulos, não observados nos grupos tratados. Como conclusão dos resultados, foi descrita a indicação de efeito positivo do extrato de cravo-da-índia contra a ação citotóxica da STZ, em um tratamento de 4 semanas (AKILA et al., 2018). Similar ao encontrado neste estudo para o maná-cubiu. Portanto, os resultados obtidos nas análises histopatológicas deste estudo sugerem que o fruto tem grande importância em evitar os danos teciduais sofridos pelos animais do controle diabético.

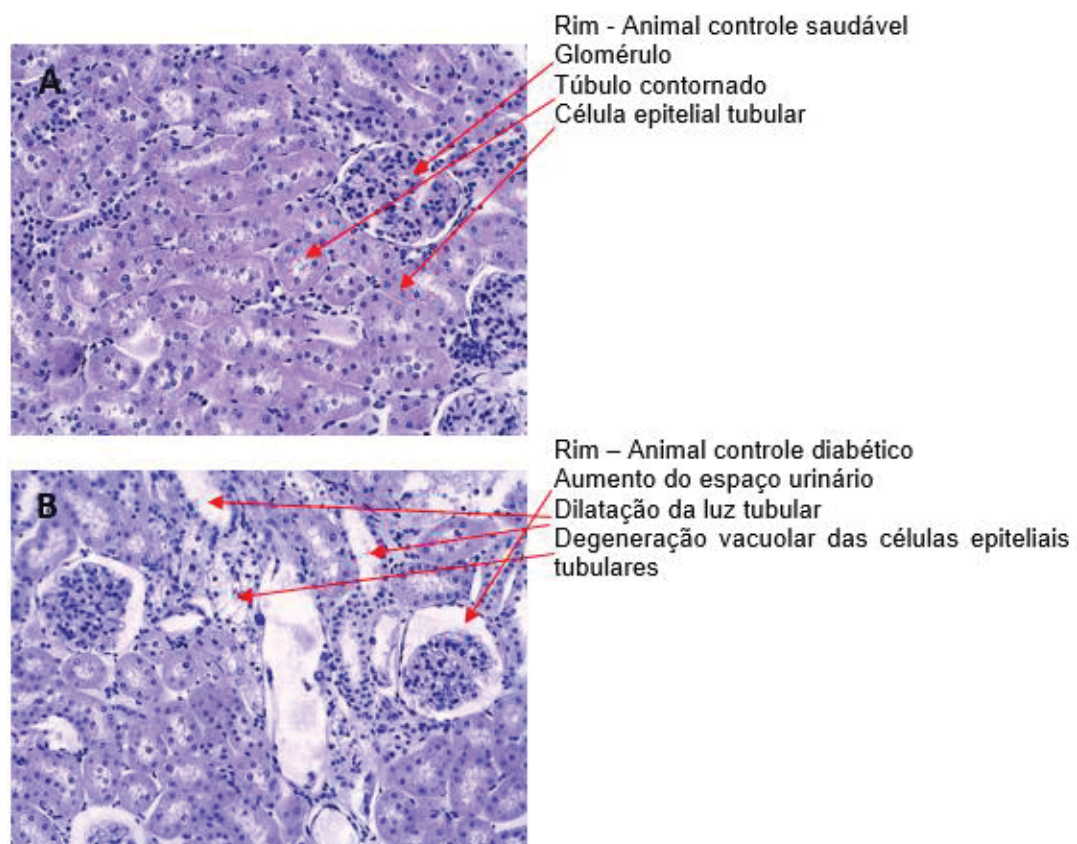
Devido à sua estrutura semelhante à da glicose, o modo como a estreptozotocina (STZ) entra nas células beta pancreáticas também é similar à glicose (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016). Após a absorção da STZ pelas células do pâncreas, ocorre a metilação do DNA, resultando na morte destas células e tornando o animal diabético. A STZ é acumulada nas células beta pancreáticas através do transportador de glicose de baixa afinidade (GLUT2) na membrana plasmática. Portanto, órgãos que também expressam esse transportador, como o rim e o fígado, por exemplo, são danificados pelo efeito da STZ, ocasionando danos às células tubulares (FIGURA 8B) e aos hepatócitos (FIGURA 7B) (LENZEN, 2007).

TABELA 26 – ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO RIM

	Glomérulos		Túbulos		Interstício	
	Congestão capilar	Dilatação do espaço urinário	Degeneração vacuolar do epitélio	Dilatação luminal	Edema	Células inflamatórias
CS	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
DM*	Ausente 100%	Presente 100%	Presente 100%	Presente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
I100	Ausente 100%	Ausente 50% Presente 50%	Ausente 50% Parcial 50%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
I200*	Ausente 100%	Ausente 80% Presente 20%	Ausente 80% Parcial 20%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
P100	Ausente 100%	Ausente 83,3% Presente 16,6%	Ausente 66,6% Parcial 33,3%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
C20	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 50% Parcial 33,3% Presente 16,6%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%

Legenda: Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20). \*n=5.

FIGURA 8 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO RIM EM COLORAÇÃO HE



Legenda: Fotomicrografias de rim dos animais pertencente aos grupos Controle Saudável (A) e Diabético (B) com identificação das estruturas Fonte: A autora (2018).

### 3.7.4.3. Análises histopatológicas do pâncreas

O desaparecimento das ilhotas pancreáticas (FIGURA 9) foi notado em todos os grupos analisados, inclusive no CS, apesar de não diabéticos. Considerando esta observação, o resultado obtido pelo grupo P100, com 16,6% de ausência deste desaparecimento é um resultado satisfatório, uma vez que estes animais foram induzidos à doença. Paralelamente, o grupo DM apresentou esta característica em todos os animais, metade com desaparecimento parcial e outra metade com total desaparecimento das ilhotas (TABELA 28). O desaparecimento parcial foi considerado quando as ilhotas encontraram-se esparsas ou com número de células diminuídas e o desaparecimento total foi considerado quando nenhuma ilhota foi localizada em todo o corte histológico analisado (um terço do tamanho total do órgão). Nenhum dos grupos tratados com o maná-cubiu apresentou fibrose nas ilhotas pancreáticas, assim como o controle saudável.

Nenhum dos grupos apresentou necrose, edema e fibrose intersticiais nos ácinos pancreáticos. Nem células inflamatórias em ambas as estruturas do tecido avaliado, no período de 28 dias em que os animais permaneceram diabéticos. Porém, a longo prazo, sabe-se que os animais diabéticos não tratados, devido ao esgotamento energético das reservas celulares, podem apresentar necrose como característica desse tipo de indução (LENZEN, 2007). Nestes casos, a necrose é causada pelos vasos espessados, causando fornecimento de oxigênio insuficiente, resultando em alterações degenerativas até a necrose (ABDUL-HAMID; MOUSTAFA, 2013).

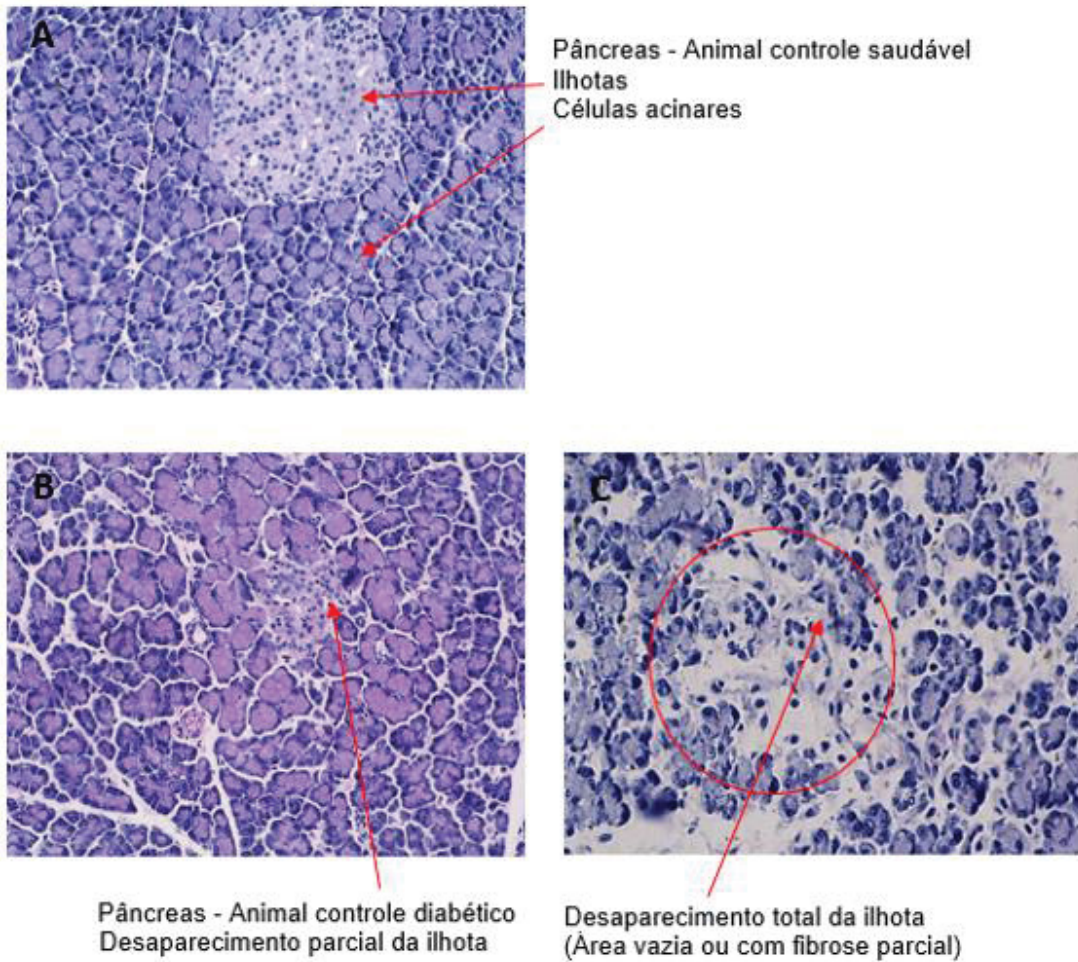
Em estudo com o uso da cúrcuma em animais diabéticos, Abdul-Hamid e Moustafa (2013) encontraram alterações histopatológicas nos animais após a indução da doença, representada pela destruição das células beta e pela presença de ácinos pancreáticos vacuolados destruídos.

TABELA 27 – ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DO PÂNCREAS

	Ilhotas			Ácinos			
	Desaparecimento	Células inflamatórias	Fibrose	Necrose	Células inflamatórias	Edema intersticial	Fibrose intersticial
CS*	Ausente 60% Parcial 20% Total 20%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
DM**	Parcial 50% Total 50%	Ausente 100%	Ausente 75% Parcial 25%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
I100*	Parcial 80% Total 20%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
I200*	Parcial 80% Total 20%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
P100	Ausente 16,6% Parcial 33,33% Total 50%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%
C20*	Parcial 20% Total 80%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%	Ausente 100%

Legenda: Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20). \*n=5, \*\* n=4.

FIGURA 9 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO PÂNCREAS EM COLORAÇÃO HE



Legenda: Fotomicrografias de pâncreas dos animais pertencente aos grupos Controle Saudável (A) e Diabético (B) com identificação das estruturas. Fonte: A autora (2018).

### 3.8. TESTES DE COMPORTAMENTO

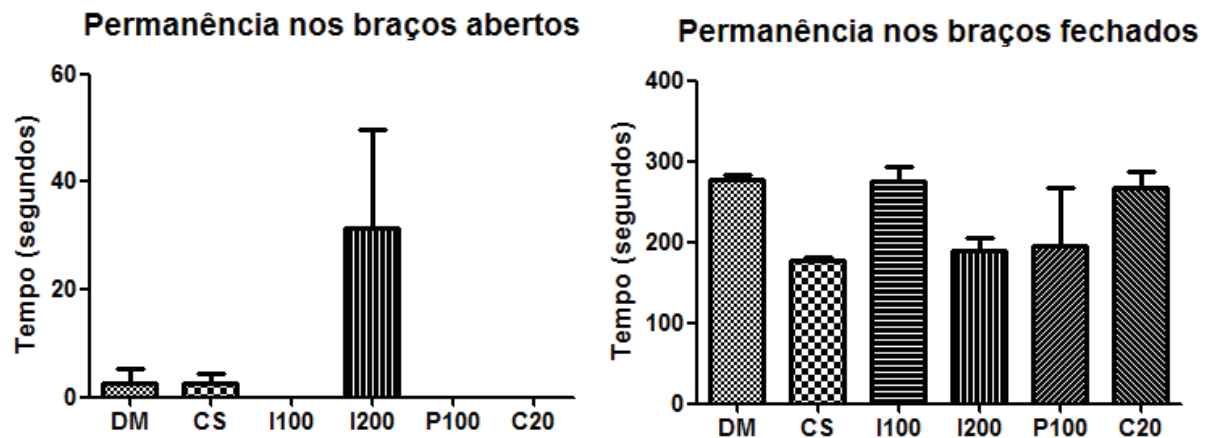
#### 3.8.1. TESTES DE COMPORTAMENTO DO ESTUDO PILOTO

##### 3.8.1.1. Labirinto em cruz elevado do estudo piloto

O teste do labirinto em cruz elevado é um teste pré-clínico comumente utilizado para investigar agentes ansiolíticos. Ratos Wistar naturalmente apresentam aversão aos braços abertos do aparato, mas quando em uso de ansiolíticos, esses animais se mostram mais susceptíveis à exploração e com maior tempo de permanência nesta parte do labirinto (FIGUEIREDO et al., 2016).

Os grupos experimentais tratados (I100, I200, P100 e C20) e não tratados (CS e DM) apresentaram maior tempo de exploração dos braços fechados do labirinto em cruz, sem que houvesse diferença estatística (FIGURA 10). O grupo que mais explorou os braços abertos do labirinto foi aquele tratado com o extrato do fruto inteiro na dose de 200 mg/kg, permanecendo em média por 47 segundos, característica sugere menor ansiedade nesse grupo de animais (FIGUEIREDO et al., 2016).

FIGURA 10 –TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO NO ESTUDO PILOTO



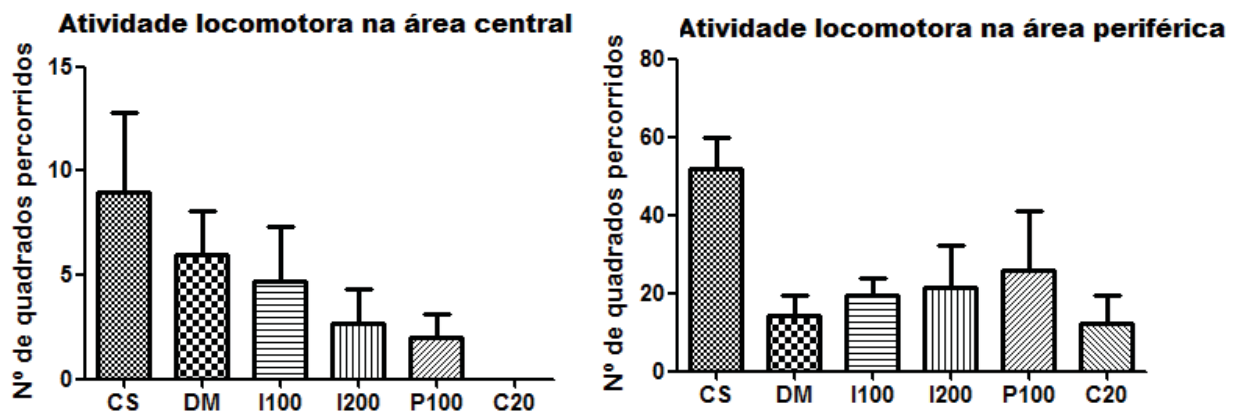
Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão, analisados pelo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (F1100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (F1200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).



### 3.8.1.2. Campo aberto do estudo piloto

De modo geral, todos os grupos tiveram preferência pela área periférica do aparato, onde os animais puderam se manter próximos às paredes de acrílico. O grupo CS apresentou maior atividade locomotora em ambas as áreas do aparato. Ratos com menores níveis de ansiedade possuem comportamento mais exploratório, enquanto que a ansiedade reduz a locomoção dos animais, que apresentam preferência em manter-se parado próximos as paredes do aparato (STRUNTZ; SIEGEL, 2018). Ratos diabéticos demonstram uma diminuição da atividade espontânea e aumento de imobilidade diante de testes comportamentais como o campo aberto, esta foi uma das observações encontradas em estudo com a casca da raiz de *Morus alba* (conhecida como amoreira branca), em que os autores relataram uma redução no número de cruzamentos nesse teste (YE et al., 2017).

FIGURA 11 –TESTE DO CAMPO ABERTO NO ESTUDO PILOTO



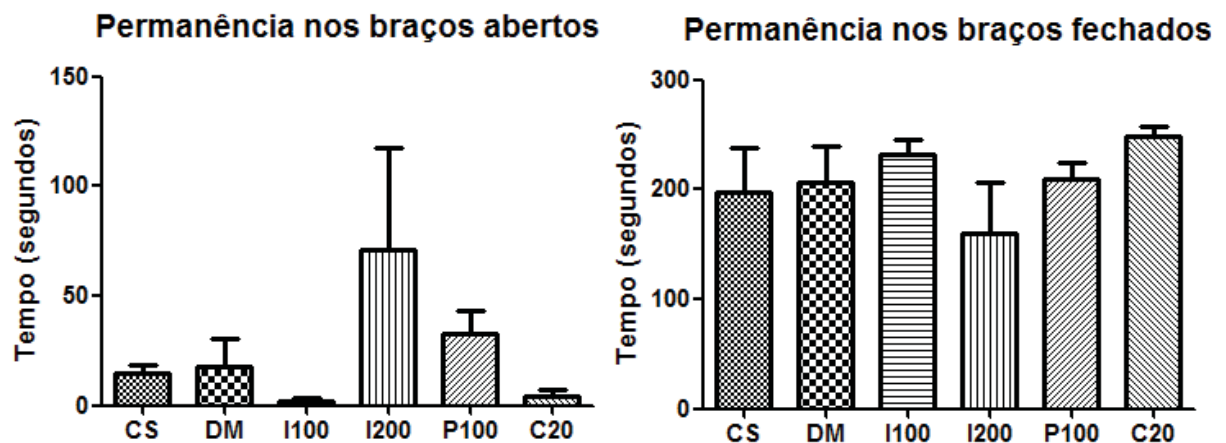
Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão sem diferença estatística. Dados analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

### 3.8.2. TESTES DE COMPORTAMENTO DO EXPERIMENTO

#### 3.8.2.1. Labirinto em cruz elevado do experimento

A preferência de todos os animais pelos braços fechados do labirinto em cruz (FIGURA 12) foi observada em todos os grupos avaliados, sem que apresentassem diferença estatística entre si. A observação da maior exploração dos braços abertos pelo grupo tratado com o fruto inteiro na dose de 200 mg/kg se repetiu nesta segunda etapa do estudo, reforçando a sugestão de este grupo apresenta menor ansiedade em comparação aos demais, inclusive o controle saudável (FIGUEIREDO et al., 2016).

FIGURA 12 –TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



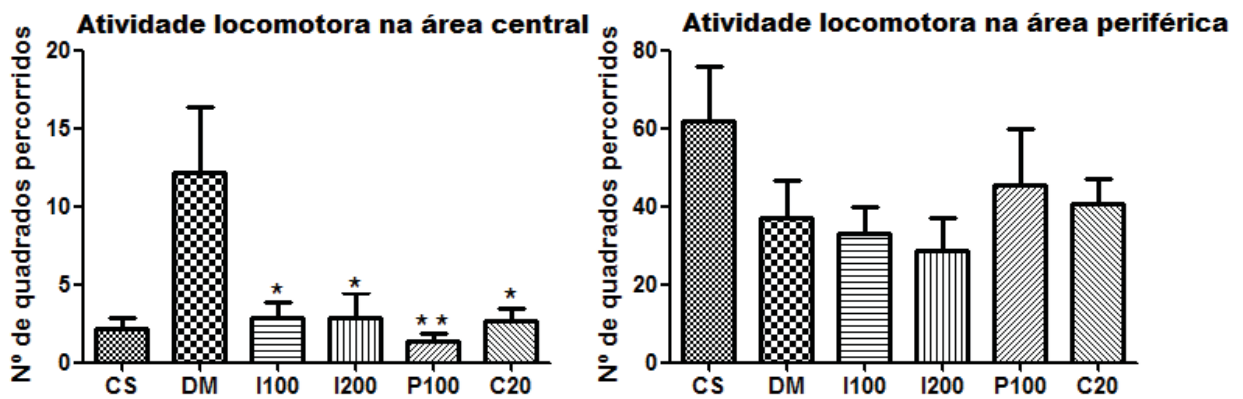
Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão, analisados pelo teste estatístico ANOVA, seguido de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

#### 3.8.2.2. Campo aberto do experimento

Na avaliação do comportamento do tipo ansioso pelo teste de campo aberto, o resultado obtido para o grupo tratado com a polpa do fruto (P100) foi o único que estatisticamente diferiu do grupo controle diabético. O grupo P100 foi aquele com maior preferência à área central do aparato e conseqüentemente, aquele que menos explorou a periferia. Apesar de o grupo controle diabético ter apresentado maior locomoção entre os grupos na área central, a média de quadrados percorridos pelo grupo foi de 12

quadrados. Considerando o mesmo parâmetro de avaliação de locomoção para área periférica, a média do grupo que mais explorou o aparato, controle saudável, foi de 61 quadrados. Sendo, o grupo P100, o segundo a mais explorar a região periférica com mais deslocamentos, ou seja, com menor nível de ansiedade entre os grupos tratados (FIGURA 13).

FIGURA 13 –TESTE DO CAMPO ABERTO



Legenda: Resultados expressos em média e desvio padrão, analisados pelo teste estatístico Kruskal-Wallis, seguido de Dunn. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Controle saudável (CS), Controle diabético (DM), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 100mg/kg (FI100), Extrato bruto do fruto inteiro na dose de 200mg/kg (FI200), Extrato bruto da polpa com semente na dose de 100mg/kg (P100), Extrato bruto da casca na dose de 20mg/kg (C20).

Os testes comportamentais em animais são realizados com a finalidade de verificar possíveis alterações relacionadas ao estresse e ansiedade que podem ou não relacionar-se à patologia ou intervenção realizada em cada tipo de experimento. No caso do diabetes, o componente emocional é presente em amplos aspectos enfrentados pelo paciente, tanto pela frustração em possuir a doença que é progressiva e não é curável, o medo das possíveis complicações e o difícil controle mesmo com adesão ao tratamento proposto, resultando em um número de incidência de até três vezes mais casos de ansiedade e depressão nestes pacientes quando comparados à população em geral (AMORIM; COELHO, 2008). Logicamente, tais fatores psicológicos não podem ser

avaliados em animais diabéticos, porém o estresse e ansiedade também podem surgir pelas alterações fisiológicas geradas pela própria doença. Tanto o diabetes quanto a depressão causam alterações fisiológicas semelhantes, fazendo com que uma dê origem a outra e vice-versa. Um dos mecanismos de a depressão induzir o surgimento do diabetes é através do aumento do cortisol e de catecolaminas, pela estimulação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Já a ansiedade possui efeitos sobre a noradrenalina, adrenalina, cortisol, ADH (hormônio anti-diurético) e glucagon, que são hormônios com atividade diretamente relacionadas à fisiopatologia do diabetes e metabolismo de glicose. Outro ponto importante a ser citado sobre estas alterações é que a insulina, em indivíduos diabéticos, mantém os níveis de energia das células mais baixo, acumulando glicose no sangue. O estresse em longo prazo também causa elevação dos níveis de glicose e nesse caso estimula maior produção de insulina desnecessariamente e sem efeito (PEREIRA et al., 2016).

## 5. CONCLUSÃO

A caracterização e identificação de componentes do maná-cubiu permitiu verificar que suas sementes apresentam teores de proteínas e lipídios superiores às demais frações. O fruto apresentou elevada atividade antioxidante, especialmente porção da casca, podendo ser comparado a outros frutos popularmente conhecidos por seu potencial antioxidante. A casca apresentaram ainda, elevados teores de compostos fenólicos totais e flavonoides.

Os ensaios de toxicidade preliminar indicaram que as frações do fruto não apresentam toxicidade, podendo ser consumidos por animais e também incluídos na dieta de populações. A partir da indução do diabetes em dose de 60mg/kg de estreptozotocina e posterior aplicação do fruto em animais experimentais, verificou-se redução significativa nos valores de hemoglobina glicada entre os grupos que receberam o fruto com animais diabéticos consumindo somente ração comercial. Na indução do diabetes com dose de 50mg/kg, os valores obtidos na curva glicêmica e na hemoglobina glicada do grupo que consumiu as cascas do fruto foram inferiores aos valores obtidos para o grupo controle diabético. Nas análises histopatológicas dos grupos experimentais, o maná-cubiu mostrou boa ação protetora dos tecidos renal, hepático e pancreático em relação aos danos gerados pelo diabetes.

Os ratos que receberam os extratos do fruto apresentaram comportamento menos ansioso que o controle diabético no teste de campo aberto na segunda etapa do estudo. A experimentação animal com modelos diabéticos permitiu avaliar aspectos ainda não muito explorados pela literatura sobre o fruto, permitindo o aprimoramento para novas pesquisas sobre o maná-cubiu.

É importante salientar ainda que quantidade de consumo necessária para buscar os efeitos protetores do fruto diante o diabetes, são quantidades possível e viáveis de ser consumidas, encorajando a inclusão do fruto na dieta. Além disso, o incentivo ao consumo do maná-cubiu de maneira sustentável do ponto de vista produtivo, visa melhorar a qualidade nutricional do fruto e agrega valor econômico para os produtores locais onde é cultivado, gerando renda e a valorização da sociobiodiversidade brasileira.

## REFERÊNCIAS

ABDUL-HAMID, M.; MOUSTAFA, N.. Protective effect of curcumin on histopathology and ultrastructure of pancreas in the alloxan treated rats for induction of diabetes. **The Journal Of Basic & Applied Zoology**, v. 66, n. 4, p.169-179, ago. 2013.

AKILA, G. DJAMIL, K., NAWAL, D., SAADIA, B. Comparative study of antihypertensive and antioxidant effects of clove and metformin on renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmanutrition**, v. 6, n. 1, p.37-44, mar. 2018.

AMORIM, I. L.; COELHO, R., Diabetes mellitus tipo 2 e sintomas psicopatológicos. **Psicologia, saúde & doenças**, v.9, n.2, p.319-333, 2008.

ARUMUGAM, G.; MANJULA, P.; PAARI, N. A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. **Journal of Acute Disease**. p.196-200, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: A.O.A.C., 2005.

BABU, P. V. A.; LIU, D.; GILBERT, E .R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 24, p.1777–1789, 2013.

BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; MORAIS, J. S., FERREIRA, I. C.. Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. **Food Chemistry**. v. 120, n. 1, p.247-254, maio 2010.

BIASSIO, A. **Agrobiodiversidade em escala familiar nos municípios de antonina e morretes (pr): base para sustentabilidade socioeconômica e ambiental**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, 2011.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 90, p.105-110, 1984.

BRAGA, A.B, MEDEIROS, T.P, ARAÚJO, B.V. Investigação da atividade antihiperglicemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. Investigação da atividade antihiperglicemiante da farinha da casca de *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae, em ratos diabéticos induzidos por aloxano. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** v. 20, n.2, 2010.

BRASIL. Sociobiodiversidade brasileira. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/sitemda/secretaria/saf-biodiv/sociobiodiversidade-brasileira#sthash.ZITiFsV9.dpuf>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

BOLAND, B. S.; EDELMAN, S. V.; WOLOSIN, J. D. Gastrointestinal Complications of Diabetes. **Endocrinology And Metabolism Clinics Of North America**, v. 42, n. 4, p.809-832, dez. 2013.

BOURSIER, G. et al. Triglycerides and glycated hemoglobin for screening insulin resistance in obese patients. **Clinical Biochemistry**, v. 53, p.8-12, mar. 2018.

CATANEO, C.B, et al. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 93-102, jan./mar. 2008.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**. v. 30; p. 441-449, 2007.

CHAHDOURA, H. et al. Hepatoprotective effect of *Opuntia microdasys* (Lehm.) Pfeiff flowers against diabetes type II induced in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p.79-87, out. 2017.

CINTRA, L. T. A. Oral health, diabetes, and body weight. **Archives of Oral Biology**. v. 73, p. 94-99, 2017.

COSTA, Neuza Maria Brunoro et al. **Nutrição experimental: Teoria à Prática**. São Paulo: Rubio, 2014. 185 p.

DERIVI S.C.N et al. Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena,L.*) em ratos. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 22, n. 2, Campinas, 2002.

FAO. Expert Consultation on Nutrition Indicators for Biodiversity. **Food Composition - ANNEX 8: Support for Countries to generate, compile and disseminate cultivar-specific nutrient composition data, and the relative priority of obtaining cultivar-specific dietary consumption data**, 2005.

FAO. **Food Composition Data: Production, Management and Use – Chapter 5 - Sampling**. 2 ed. Rome: Fao publishing Management Service, 2003.

FIGUEIREDO, D. A. et al. Effects of bark flour of *Passiflora edulis* on food intake, body weight and behavioral response of rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, n. 5, p.595-600, set. 2016.

FILHO, J. M. **Estudo da fragilidade em fêmures de ratos diabéticos pela análise densitométrica e biomecânica**. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

GONÇALVES, K. M. et al., biological activities of *Solanum Sessiliflorum* dunal. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 29, n. 4, p. 1028-1037, July/Aug. 2013.

GONDI, M.; RAO, U. J. S. Prasada. Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (stz)-induced diabetic rats. **J food sci technol**, India v. 52, n. 12, p. 7883–7893, p. 16-26. 2015.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 46, n. 1, 2002.

HERNANDES, L. C. et al. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**. v. 62, p.121-127, ago. 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. Ed. São Paulo: IMESP,1985.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, Patrícia; SAITOVITCH, David. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 43, n. 1, p.3-10, jan. 2010.

KESSLER M. A.; MEINITZER A.; PETEK W. et al. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the Albumin Blue 580 fluorescence assay. **Clin Chem**, v. 43, p. 996–1002, 1997.

LEME, J.A.C.A. et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para Indução de diabetes em ratos wistar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 3, p. 451-456, 2010.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p.216-226, 18 dez. 2007.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. **Acta Cirurgia Brasileira**, São Paulo, v. 2, n. 18, p.132-142, abr. 2003.

LIMA, M. S.; MALTA, M.; LAMAS, L. Comparação dos efeitos hiperglicemiantes da xilazina em novilhas Frísia e novilhas Mertolengas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 539, p.149-152, 2001.

LOVEGROVE, J. A. **The Nutrition Society Textbook Series: Nutrition Research Methodologies**. 1ª Edição. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, p. 335, 2015.

MAIA J. R. P. et al. Efeito hipolipemiante da suplementação dietética com a farinha do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) em ratos hipercolesterolêmicos **Rev. Bras. PI. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.112-119, 2015.

MASCATO, D. R. L. H. et al., Evaluation of Antioxidant Capacity of *Solanum sessiliflorum* (Cubiu) Extract: An In Vitro Assay. **Journal of Nutrition and Metabolism**, 2015.



MATTARAIA, V. G. de M.; MOURA, A. S. A. M. T. Produtividade de ratos Wistar em diferentes sistemas de acasalamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 8, p.1490-1496, ago. 2012.

MEDA, A., et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline content in *Burkina Faso* honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571–577, 2005.

MELO, M. D. G. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia plena**. v.8, n.4, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**. v.31, p. 426–428, 1959.

MONTEIRO, A. M., PALMA, I. Lipid profile and persistent lipid abnormalities in diabetic patients – a retrospective study. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**. v.11, p. 197-201. Dec. 2016.

MOURA, L. P. et al. Spirulina, exercício e controle da glicemia em ratos diabéticos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Rio Claro, v. 56, n. 1, p. 25-32, fev. 2012

NELSON, N. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.153, p.375-380, 1944.

OLIVEIRA, D. M. **Influência da ingestão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus e metabolismo de glicose em ratos Wistar**. Apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Departamento de Nutrição para obtenção do grau de Mestre. São Paulo; p. 78, 2008.

OLIVEIRA, H. P. **Elaboração de nectar de cubú (*Solanum sessiflorum* Dunal) e avaliação das características físico-químicas e sensoriais durante o armazenamento**. 1999. 68 f. Tese (Doutorado)-Universidade do Amazonas, Manaus, 1999.

OLIVEIRA, T. K. B.; BARROS NETO, J. J. S.; ALMEIDA, I. B. **Princípios Básicos de Pesquisa com Animais de Laboratório**. 1. ed. Aracajú: IFS, 2016. v. 1. 105p.

PALAFIX-CARLOS H.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. **Food Chemistry** v.135, p. 105–11, 2012.

PEREIRA, L. T., et al. Exercícios físicos aquáticos e depressão: estudo clínico randomizado. **Revista Científica JOPEF**, v. 21, n.01, p. 1806-1508, 2016.

PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 646, p.107-112, maio 2018.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**. v. 78, p.13-31, mar. 2016.

RIBEIRO, C. A. O.; REIS FILHO, H. S.; GRÖTZNER, S. R. **Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia**. São Paulo: Santos, 2012.

ROCHA, M. T. A. **Efeitos de Momordica charantia L. em ratos diabéticos**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

ROCKENBACH, I. I. et al. Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em Fruto de physalis peruviana l. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.19, n.3, p. 271-276, jul./set. 2008.

RODRÍGUEZ, V.; PLAVNIK, L.; TALAMONI, N. T. Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p.95-102, set. 2018.

ROGER, N. J. Fructosamine a new approach to the estimation of sérum glycosyl protein; an index of diabetic control. **Clin Chim Acta**. 127, p. 87-95, 1982.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS**. Comunicado Técnico 128. Embrapa, Fortaleza, 2007.

SEQUI, S. J. M. Androgenesis in *Solanaceae*. **Methods in Molecular Biology**, n. 1359, p. 209-44, 2016.

SERENO, A. B. et al. Mineral profile, carotenoids and composition of cocona (*Solanum sessiliflorum Dunal*), a wild Brazilian fruit. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 72, p.32-38, set. 2018.

SERNA-COCK, L.; VARGAS-MUÑOZ, D. P.; RENGIFOGUERRERO, C. A. Chemical characterization of the pulp, peel and seeds of cocona (*solanum sessiliflorum dunal*). **Brazilian journal of food technology**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 192-198, set. 2015.

SIGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorunetry of total phenolics with phosphomolidic-phosphotungstic acid reagentes. **American jornal of enology and niticulture**. v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SILVA, K. E. et al. Perfil metabólico de ratos diabéticos submetidos ao exercício físico. **Motriz**, Rio Claro, v. 3, n. 10, p.189-193, dez. 2004.

SILVA FILHO, D. F. et al. Caracterização e avaliação do potencial agronomico e nutricional de etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) da Amazonia. **Acta Amazônica**, v. 35, n. 4, p. 399-406. 2005.

SILVA FILHO, D. F. 2002. **Discriminação de etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal Solanaceae) da Amazônia, com base em suas características morfológicas e químicas**. INPA/UFAM. Manaus, AM. Tese de Doutorado. 117 p.

SILVA FILHO, D.F. 1998. **Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo y utilizacion**. Caracas, Venezuela: Secretaria Pro- Tempore. Tratado de Cooperacion Amazonica. 114p.

SILVA FILHO, D.F.; Anunciação Filho, C.J.; Noda, H.; Reis, O.V. Variabilidade genética em populações naturais de cubiu da Amazônia. **Horticultura Brasileira**. v.14, p.9-15, 1996.

SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, v.3, p.727-732, jul.-set. 2008.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.160, n.1, p.61-68, 1945.

STRUNTZ, K. H.; SIEGEL, J. A. Effects of methamphetamine exposure on anxiety-like behavior in the open field test, corticosterone, and hippocampal tyrosine hydroxylase in adolescent and adult mice. **Behavioural Brain Research**. v. 348, p.211-218, ago. 2018.

TAYYEM, R. F., HEATH, D. D., AL-DELAYMI, W. K., & ROCK, C. L. Curcumin content of turmeric and curry powders. **Nutrition and Cancer**, v.55, n.2, p.126–131, 2006.

WANG, Ting et al. Effect of *Sophora japonica* total flavonoids on pancreas, kidney tissue morphology of streptozotocin-induced diabetic mice model. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 24, n. 3, p.741-747, mar. 2017.

YE, Mei et al. Root bark of *Morus alba* ameliorates the depressive-like behaviors in diabetic rats. **Neuroscience Letters**, v. 637, p.136-141, jan. 2017.

YOKOZAWA T., C. H. Y., QUN H. E. Effectiveness of green tea tannin on rats with chronic renal failure. **Biosci Biotechnol Biochem**. 60, p.1000–1005, 1996.

YOSHINO, G., et al. Effect of dietary fructose on triglyceride turnover in streptozotocin-diabetic rats. **Atherosclerosis** v.79, n.1, p.41–46, 1989.

YUYAMA, L. K. O. et al. Estudo da influência do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) sobre a concentração sérica de glicose. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64, n.2, p.232-236, 2005.

YUYAMA, L. K. O., et al. Quantificação de macro e micro nutrientes em algumas etnovariedades de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal). **Acta Amazónica**, v. 37, n.3, p. 425–430, 2007.

YUYAMA L. K. O. et al. Desenvolvimento e aceitabilidade de geléia dietética decubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 929-934, out.-dez. 2008.

**ANEXOS**

## ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



3425834357251855

### AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010004/2015-7

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR

CNPJ: 750.956.790/0001-49

Representante Legal: GRACIELA INES BOLZON DE MUNIZ

Cargo/Função: Coordenadora de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

CPF: 674.273.759-04 RG: 1439535

Projeto: QUALIDADE NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA DE FRUTOS DA SOCIOBIOVERSIDADE

Coordenador do Projeto: Sila Mary Rodrigues Ferreira

CPF: 231.917.400-15 RG: 3658868 - SSP / PR

**Finalidade do projeto:** Mesmo sendo o Brasil um país rico em biodiversidade poucas espécies são estudadas pelos pesquisadores brasileiros. A valorização e a promoção do conhecimento de frutos da nossa biodiversidade é um passo importante para o reconhecimento dessa riqueza e para a Segurança Alimentar e Nutricional da população que utiliza esses frutos como fonte alimentar e de renda. Desta forma, o presente projeto tem como objetivo determinar a qualidade nutricional e fitoquímica de frutos da sociobiodiversidade. O delineamento experimental envolverá a coleta de aproximadamente 15 kg de frutos em diferentes estádios. Após a colheita os frutos serão transportados ao laboratório em caixas de embalagem de PEAD. Os frutos serão classificados nos diferentes estádios de maturação, armazenados à temperatura e submetidos à análise física, físico-química e fitoquímica. Após as análises físicas, os frutos serão descascados e as partes separadas (casca, sementes e polpa). Posteriormente serão realizadas as análises físico-químicas, com a fruta in natura, para cada parte (casca, polpa, semente e folhas). Para as análises fitoquímicas as cascas e polpa serão congeladas e liofilizadas. Espera-se que a caracterização dos frutos contribua para o conhecimento, utilização e agregação de valor dos frutos como forma de melhorar a renda das comunidades tradicionais.

**Amostras a serem acessadas:**

**Grupos Taxonômicos:** Os frutos avaliados serão: *Jacaritã apinosa* (Aubl) A.DC, conhecido como Jacaritã ou mamão do mato; *Morus nigra* L., amora; *Perezkia aculeata* Miller, Ora-pro-nobis; *Acca sellowiana* (Berg) Burret), Goiabinha do Mato; *Eugenia pyriformis*, Uvaia; *Paicium castellanum*, Araçá; *Solanum sessiliflorum*, Maracujá; *Syzygium malaccense*, Jambo e *Passiflora actinia* Hook ou maracujá-do-mato ou maracujá-silvestre. Previsão da coleta: Início da coleta: 20 de janeiro de 2015 a Janeiro de 2019

**Tipo de material/quantidade de amostras:** 15 kg por espécie estudada

**Local de depósito de subamostra:** Museu Botânico Municipal - MBM/MBM

**Equipe do projeto:** SILA MARY RODRIGUES FERREIRA / CPF 231.917.400-15

OBDULIO GOMES MIGUEL / CPF 230.507.729-72

HELLEN ABREU / CPF 077.941.119-60

CRISTIANE FAGUNDES / CPF 044.504.099-81

IZABELLA CLÓTILDE MARINHO DE ABREU / CPF 088.063.809-47

LUIZA BUZATTO SCHEMIKO / CPF 078.320.479-50

JOSIANE DE FATIMA GASPARI DIAS / CPF 719.581.189-15

DEBORA LUISE GUNHA / CPF 052.311.789-82

MONICA DE CALDAS ROSA DOS ANJOS / CPF 889.379.099-87

BRUNA ISADORA TRENNEPOHL / CPF 045.417.729-14

CELLEN GIACOMELLI GROTH LUIZ / CPF 022.763.819-06

**Validade da Autorização:** 15/01/2015 a 15/01/2019

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço [apg@cnpq.br](mailto:apg@cnpq.br) e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010004/2015-7. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço [apg@cnpq.br](mailto:apg@cnpq.br), preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 07 de Janeiro de 2015

Marcelo Marcos Morales  
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

*Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 3425834357251855 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.*

**ANEXO 2 – IDENTIFICAÇÃO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL PARA DEPÓSITO  
DA EXSICATA NO HERBÁRIO**



**Prefeitura Municipal de Curitiba**  
Secretaria Municipal do Meio Ambiente  
Departamento de Produção Vegetal  
Divisão do Museu Botânico Municipal  
**Herbário MBM**

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os fins que se fizerem necessários que se encontra tombada no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM), uma exsicata de planta pertencente à família Solanaceae, cujo nome científico é *Solanum sessiliflorum* Dunal, coletada na localidade Estrada do Rio Pequeno, Município de Antonina, Estado do Paraná, Brasil, coordenadas 25°16'31"S e 48°41'55"W, por Paulo Marceñiuk, em 30/01/2016, depositada por Aiane Benevide Sereno, atendendo ao Projeto CNPq nº 010004/2015-7. A referida exsicata foi identificada por Aiane Benevide Sereno, e encontra-se depositada no Herbário MBM sob o nº de registro **379033**, estando à disposição e podendo ser consultada para todas e quaisquer eventualidades.

Curitiba, 04 de julho de 2016

\_\_\_\_\_  
José Tadeu Weidlich Motta  
Curador do Herbário MBM  
Matr. 35721



**ANEXO 3 – CERTIFICADO DO CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais)**

Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 978 B

**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

**STATEMENT**

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.122454/2016-38

**APROVADO/APPROVAL:** 17/10/2017 – R.O. 09/2017

**TÍTULO:** Caracterização físico-química e análise dos efeitos hipoglicemiantes de manacubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) e jambo (*Syzygium malaccense* L.) em ratos

**TITLE:** Characterization and evaluation of hypoglycemic effects of (*Solanum sessiliflorum* Dunal) and rose apples (*Syzygium malaccense* L.) in rats

**AUTORES/AUTHORS:** Cláudia Carneiro Hecke Krüger, Luciana Gibbert, Aiane Benevide Sereno, Eduardo Gomes de Sousa Neto, Fernando Augusto Lavezzo Dias, Renata Bertin, Elisabeth do Nascimento, Marina Talamini Piltz, Aline Borsato Hauser, Deise Perhs Montrucchio.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Nutrição

Prof.ª Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA