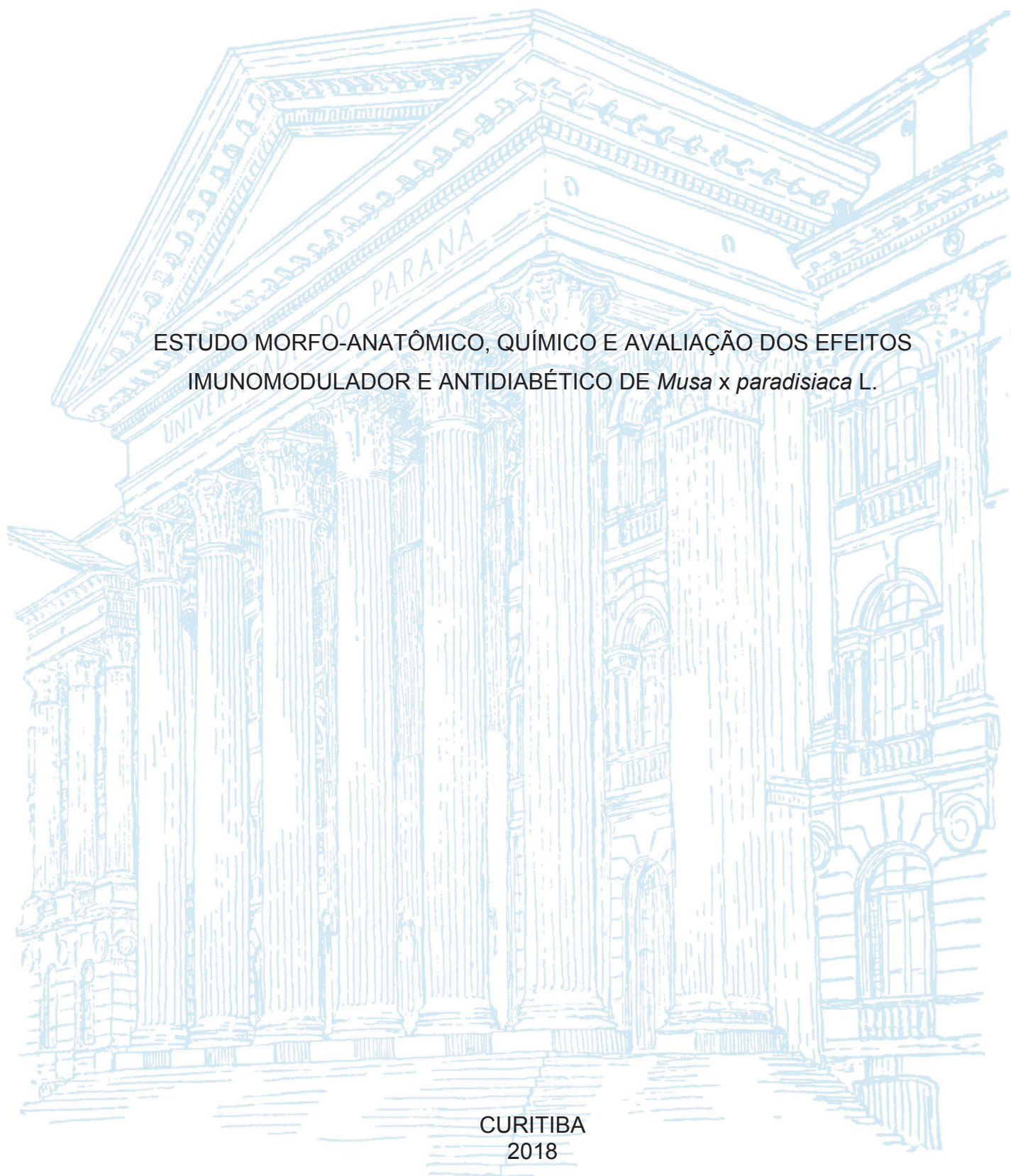


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

ESTUDO MORFO-ANATÔMICO, QUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
IMUNOMODULADOR E ANTIDIABÉTICO DE *Musa x paradisiaca* L.

CURITIBA
2018



RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA

ESTUDO MORFO-ANATÔMICO, QUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
IMUNOMODULADOR E ANTIDIABÉTICO DE *Musa x paradisiaca* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Medicamentos, Insumos e Correlatos, Linha de pesquisa Produção e Qualidade, Departamento de Farmácia do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA
2018

Vilhena, Raquel de Oliveira

Estudo morfo-anatômico, químico e avaliação dos efeitos imunomodulador e antidiabético de *Musa x paradisiaca* L / Raquel de Oliveira Vilhena. - Curitiba, 2018. 139 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Musaceae. 2. Teste de tolerância a glucose. 3. Plantas medicinais / Ação farmacológica. 4. Agentes hipoglicemiantes. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321



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

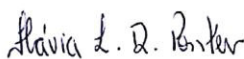
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **RAQUEL DE OLIVEIRA VILHENA** intitulada: **ESTUDO MORFO-ANATÔMICO, QUÍMICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E ANTIDIABÉTICO DE *Musa x paradisiaca* L.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

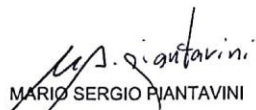
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 18 de Julho de 2018.


ROBERTO PONTAROLO
Presidente da Banca Examinadora


FLAVIA LADA DEGAUT PONTES
Avaliador Externo


RAFAEL LEANDRO DE CAMPOS
Avaliador Externo


MARIO SERGIO PIANTAVINI
Avaliador Externo


DANIELA FLORÊNCIO MALUF
Avaliador Externo

RESUMO

Musa x paradisiaca, conhecida como banana, é largamente cultivada em regiões tropicais. Diferentes partes desta planta, especialmente inflorescências, têm sido utilizadas para o tratamento de várias doenças na medicina tradicional. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador e antidiabético dos extratos de flores e brácteas de *M. x paradisiaca*. Uma revisão sistemática foi conduzida com base nas recomendações da Colaboração Cochrane e PRISMA para avaliar as propriedades de *Musa* spp. como alternativa para o controle do diabetes mellitus. A inflorescência foi coletada em Morretes-PR, identificada no Herbário do Museu Botânico de Curitiba. Um estudo morfo-anatômico foi realizado para caracterização das flores e brácteas por microscopia de luz. Os extratos foram preparados a partir do material vegetal seco, utilizando diferentes solventes e extração assistida por ultrassom. Os extratos foram comparados em relação ao teor de compostos fenólicos totais utilizando um planejamento experimental do tipo centroide simplex. Adicionalmente, os compostos majoritários foram identificados por CLAE-DAD-EM. A atividade dos extratos aquosos e hidroetanólicos na via clássica e alternativa do sistema complemento foram avaliados por ensaio hemolítico *in vitro*. Além disso, a atividade antidiabética dos extratos aquosos e frações metanólicas foi avaliada em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Eles foram tratados durante 20 dias com os extratos ou insulina. Também foram analisadas alterações histológicas hepática e renal dos animais. De acordo com a revisão sistemática, 17 artigos foram incluídos, os quais apontam para o potencial antidiabético dos extratos de flores de *Musa* spp. No estudo morfoanatômico, as características identificadas foram: brácteas com epiderme unisseriada, feixes de fibras próximas ao floema e distribuídos no mesófilo, estômatos tetracíticos em ambas as faces e presença de papilas; tépalas com epiderme pluriestratificada e feixes vasculares alinhados ao lado da face abaxial; anteras tetrasporangiais com feixe vascular único e colateral e ovário trilocular com epiderme unisseriada. Em relação a influência dos solventes no teor de compostos fenólicos totais extraídos, tanto para as brácteas como para as flores, a mistura de solventes água e etanol representou a melhor extração quantitativa para esses compostos. Na caracterização química foram identificados 15 compostos, dentre eles fenilpropanoides derivados do ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e um flavonol glicosilado. Na avaliação da atividade imunomoduladora *in vitro*, os extratos apresentaram atividade inibidora significativa da via clássica do sistema complemento, destacando-se o resultado do extrato hidroetanólico da bráctea. No estudo *in vivo*, os grupos tratados com extratos aquosos da bráctea e fração metanólica da flor apresentaram efeito significativo no perfil glicêmico pós-sobrecarga de glicose em comparação ao grupo não-tratado. Além disso, os extratos promoveram uma redução na glicemia de jejum e redução nas alterações histológicas hepáticas e renais dos animais. Os resultados encontrados neste trabalho mostraram o potencial imunomodulador na via clássica do sistema complemento e antidiabético das flores e brácteas de *M. x paradisiaca*. Adicionalmente, os extratos na concentração de 200 mg/kg apresentaram um efeito protetor nos tecidos hepático e renal dos ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Esses efeitos podem estar relacionados a presença dos compostos fenilpropanoides derivados do ácido *p*-cumárico.

Palavras-chave: Musaceae. Planta medicinal. Atividade farmacológica. Atividade hipoglicêmica. Tolerância à glicose oral.

ABSTRACT

Musa x paradisiaca is widely cultivated in tropical regions. Extracts of parts of this plant, especially inflorescences, have been used for the treatment of various diseases in traditional medicine. The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory and antidiabetic effects of the extracts of flowers and bracts of *M. x paradisiaca*. A systematic review was conducted based on the recommendations of the Cochrane Collaboration and PRISMA to evaluate the properties of *Musa* spp. as a natural alternative for the control of diabetes mellitus. The inflorescence was collected in Morretes-PR and was identified in the Herbarium of the Botanical Museum of Curitiba. A morpho-anatomical study was performed to characterize the flowers and bracts by light microscopy. The extracts were prepared from dry plant material using different solvents and ultrasonic assisted extraction. The extracts were compared considering the content of total phenolic compounds using a simplex-centroid design. Additionally, the major compounds were identified by HPLC-DAD-MS. The activity of aqueous and hydroethanolic extracts in the classical and alternative pathway of the complement system were evaluated by *in vitro* hemolytic assay. In addition, the antidiabetic activity of the aqueous extracts and methanolic fractions was evaluated in streptozotocin-induced diabetic rats. Rats were treated for 20 days with extracts or insulin. Hepatic and renal histological changes in these animals were also analyzed. Overall, 17 studies were included in the systematic review, which point to the antidiabetic potential of the *Musa* spp. In the morpho-anatomical study the following features were identified: uniseriate epidermis, fiber caps next to the phloem, tetracytic stomata on both faces, and the presence of papillose for bracts; tepals with multilayered epidermis and vascular bundles aligned next to abaxial face; tetrasporangiate anthers with single vascular bundle, and trilocular ovary with uniseriate epidermis. In relation to the influence of the solvents on the content of total phenolic compounds extracted, for both bracts and flowers, the mixture of solvents water and ethanol represented the best quantitative extraction for these compounds. In the chemical characterization, 15 compounds were identified, among them phenylpropanoids derived from *p*-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid, and a glycosylated flavonol. In the *in vitro* study, the extracts showed significant inhibitory activity of the classical pathway of the complement system, especially the hydroethanol extract of the bract. In the *in vivo* study, the groups treated with aqueous extracts of the bract and the methanolic fraction of the flower had a significant effect on the glycemic profile after glucose overload when compared to the untreated group. In addition, the extracts promoted a reduction in fasting glycemia and in hepatic and renal histological changes of the animals. The results found in this study showed the immunomodulatory potential in the classical pathway of the complement system and antidiabetic effect of the flowers and bracts of *M. x paradisiaca*. In addition, extracts at the concentration of 200 mg / kg had a protective effect on the hepatic and renal tissues in streptozotocin-induced diabetes rats. These effects may be related to the presence of phenylpropanoid compounds derived from *p*-coumaric acid.

Keywords: Musaceae. Herbal medicine. Pharmacology. Hypoglycemic effect. Oral glucose tolerance.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proteger e iluminar o meu caminho.

À minha mãe, Marisa de Oliveira, e ao meu esposo Breno Maurício Marson, por todo amor, carinho, paciência e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por estar ao meu lado sempre disposto a ajudar. Obrigada pela oportunidade de aprendizado, pela confiança, pelo respeito e incentivo na elaboração desse trabalho. Minha sincera gratidão, respeito e admiração.

À professora Denise Brentan da Silva pela colaboração na caracterização química dos extratos.

Às professoras Rosângela Gonçalves Peccinini e Amanda Martins Baviera pela colaboração no ensaio em modelo animal.

Às professoras Erika Amano, Jane Manfron Budel e Thalita Gilda Santos pela colaboração nas análises morfo-anatômicas do material vegetal.

À professora Isabele Kasahaya Borges e ao professor Dib Ammar pela colaboração nas análises histológicas de tecido animal.

Ao professor Michel Leandro de Campos, por compartilhar suas experiências e aprendizado com muita paciência e dedicação, contribuindo para o aprimoramento desse trabalho.

À querida amiga Flávia Lada Degaut Pontes, por compartilhar suas experiências e aprendizado com muita paciência e dedicação. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo. Meu carinho, amizade, admiração e enorme gratidão.

À querida amiga Mariana Millan Fachí pelo companheirismo, amizade, por compartilhar suas experiências e aprendizado, pela colaboração na condução da revisão sistemática. Meu carinho, amizade, admiração e enorme gratidão.

Aos amigos do CEB e GEATS pelo companheirismo e amizade. Por tornar esses anos mais leves e divertidos.

Aos amigos da UNESP - Araraquara pelo carinho, paciência e especialmente à Ingrid Delboni Figueiredo, Jonata Oliveira e Taísa Busaranho Franchin pela colaboração no ensaio em modelo animal.

À Capes, pela bolsa de estudo concedida.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	<i>Musa x paradisiaca</i> L.....	20
FIGURA 2-	ESPAÇO EXPERIMENTAL PARA TRÊS VARIÁVEIS: A MISTURA DOS TRÊS COMPONENTES LIMITA-SE AOS PONTOS PERTENCENTES AO TRIÂNGULO.....	30
FIGURA 3-	CURVAS DE NÍVEL DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA TRÊS VARIÁVEIS.....	30
FIGURA 4-	PLANEJAMENTO EM REDE SIMPLEX.....	32
FIGURA 5-	PLANEJAMENTO CENTROIDE SIMPLEX.....	32
FIGURA 6-	ETAPAS INICIAIS E FINAIS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELAS VIAS CLÁSSICA, ALTERNATIVA E DAS LECTINAS E ETAPAS FINAIS COM FORMAÇÃO DO MAC.....	35
FIGURA 7-	ESTRUTURA QUÍMICA DA ESTREPTOZOTOCINA (STZ).....	37
FIGURA 8-	SÍNTESE DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	66
FIGURA 9-	FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE ARTIGOS (FLOWCHART PRISMA).....	70
FIGURA 10-	DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS DE ACORDO COM O TIPO DE AMOSTRA ANALISADA.....	71
FIGURA 11-	GRÁFICO DO RISCO DE VIÉS PARA ESTUDOS DE INTERVENÇÃO EM ANIMAIS.....	78
FIGURA 12-	RESUMO DOS RESULTADOS DO CONSENSO DAS AVALIAÇÕES DE RISCO DE VIÉS PARA OS ESTUDOS EM ANIMAIS.....	79
FIGURA 13-	GRÁFICO DO RISCO DE VIÉS PARA ESTUDO DE INTERVENÇÃO EM HUMANO.....	80
FIGURA 14-	RESUMO DOS RESULTADOS DO CONSENSO DAS AVALIAÇÕES DE RISCO DE VIÉS PARA O ESTUDO EM HUMANO.....	80
FIGURA 15-	MORFOLOGIA DA <i>Musa x paradisiaca</i> L. A. INFLORESCÊNCIA NA BANANEIRA INDICANDO FLORES (fl), BRÁCTEAS (br) e RAQUIS (ra); B. DETALHES DAS BRÁCTEAS E AGRUPAMENTO DE FLORES; C. FLORES ANDRÓGENAS.....	82
FIGURA 16-	ANATOMIA DAS BRÁCTEAS DE <i>Musa x paradisiaca</i> L. SECÇÕES TRANSVERSAIS (A , B , C , D); IMAGEM DA SUPERFÍCIE (E).....	83
FIGURA 17-	ANATOMIA DAS FLORES E OVÁRIO DE <i>Musa x paradisiaca</i> L. – SECÇÕES TRANSVERSAIS. A. CARPELO (OVÁRIO TRILOCULAR), ESTAMES (st), TÉPALAS E TÉPALA LIVRE; B. OVÁRIO; C. TÉPALA INTERNA; D. TÉPALA EXTERNA.....	84
FIGURA 18-	ANATOMIA DA ANTERA DE <i>Musa x paradisiaca</i> L. – SECÇÕES TRANSVERSAIS. A. ANTERA TETRAESPORANGIADA; B. REGIÃO DO CONECTIVO E FEIXE VASCULAR (fv).....	85
FIGURA 19-	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO ÁCIDO GÁLICO E EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	87
FIGURA 20-	GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS PARA RESPOSTA DE TEOR COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA BRÁCTEA.....	89

FIGURA 21-	CURVA DE NÍVEL DO MODELO QUADRÁTICO PARA RESPOSTA TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA BRÁCTEA.....	89
FIGURA 22-	GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS PARA RESPOSTA DE TEOR COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA FLOR.....	90
FIGURA 23-	CURVA DE NÍVEL DO MODELO ESPECIAL CÚBICO PARA RESPOSTA TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA FLOR.....	91
FIGURA 24-	CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS (MODO NEGATIVO) DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS BRÁCTEAS (A) E DAS FLORES (C), E DOS EXTRATOS DAS BRÁCTEAS E DAS FLORES APÓS REMOÇÃO DOS AÇÚCARES POR AMBERLITE XAD2 (B, D – RESPECTIVAMENTE).....	92
FIGURA 25-	EXEMPLO DE ESTRUTURA DOS DERIVADOS DE FENILPROPANOIDES HEXOSÍDEOS.....	95
FIGURA 26-	CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS (MODO NEGATIVO) DOS EXTRATOS DAS FLORES DE <i>M. x paradisiaca</i> OBTIDOS COM METANOL (A), ACETONA (B), ETANOL 50 % (v/v) (C) E ÁGUA (D).....	96
FIGURA 27-	CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS (MODO NEGATIVO) DOS EXTRATOS DAS BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i> OBTIDOS COM METANOL (A), ACETONA (B), ÁGUA (C) E ETANOL 50 % (v/v) (D).....	97
FIGURA 28-	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA HEMÓLISE DA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO SOB AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE FLORES E BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i>	101
FIGURA 29-	PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA HEMÓLISE DA VIA ALTERNATIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO SOB AÇÃO DOS EXTRATOS DE FLORES E BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i>	103
FIGURA 30-	CURVA DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE FLORES E BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i> DURANTE 15 DIAS....	106
FIGURA 31-	COMPARAÇÃO DAS ÁREAS SOB A CURVA (ASC) DO TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE FLORES E BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i> DURANTE 15 DIAS.....	107
FIGURA 32-	COMPARAÇÃO DA GLICEMIA DE 12h DE JEJUM DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE FLORES E BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i> DURANTE 15 DIAS....	107
FIGURA 33-	ACHADOS HISTOLÓGICOS EM FÍGADO DE RATO NORMAL (A), DIABÉTICO (B) E DIABÉTICO TRATADO DURANTE 20 DIAS COM ÁCIDO p-CUMÁRICO (DpAC) (C), INSULINA (D) E EXTRATOS DE <i>M. x paradisiaca</i> : EAB (E), FMB (F), EAF (G) E FMF (H). COLORAÇÃO HE (Obj. 40x).....	112

FIGURA 34-	ACHADOS HISTOLÓGICOS DE RIM DE RATO NORMAL (A), DIABÉTICO (B) E DIABÉTICO TRATADO DURANTE 20 DIAS COM ÁCIDO p-CUMÁRICO (C), INSULINA (D) E EXTRATOS DE <i>M. x paradisiaca</i> : EAB (E), FMB (F), EAF (G) E FMF (H). COLORAÇÃO HE (Obj. 40x).....	114
------------	--	-----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS AVALIADAS PARA <i>Musa</i> <i>spp</i>	22
QUADRO 2-	COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS EXTRATORAS EM TERMOS DE PROPORÇÃO DE SOLVENTES.....	51
QUADRO 3-	CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FLOR (EAF) E BRÁCTEA (EAB) E HEPARINA AVALIADAS NO ENSAIO DA VIA CLÁSSICA.....	59
QUADRO 4-	CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE FLOR (EEF) E BRÁCTEA (EEB) E HEPARINA AVALIADAS NO ENSAIO DA VIA ALTERNATIVA.....	59
QUADRO 5-	DESCRIÇÃO DOS GRUPOS E RESPECTIVOS TRATAMENTOS.....	67
QUADRO 6-	RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS.....	72
QUADRO 7-	RESULTADOS DAS ANÁLISES QUALITATIVAS DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE FLORES E BRÁCTEAS DE <i>M. x paradisiaca</i>	86
QUADRO 8-	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES PRESENTES NOS EXTRATOS DE <i>M. x paradisiaca</i> POR CLAE-DAD-EM.....	93
QUADRO 9-	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE FÍGADO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>M. x paradisiaca</i> DURANTE 20 DIAS.....	113
QUADRO 10-	ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE RIM DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>M. x paradisiaca</i> DURANTE 20 DIAS.....	115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO – EAG) EXTRAÍDOS DA BRÁCTEA E FLOR DE <i>M. x paradisiaca</i> OBTIDA PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.....	88
TABELA 2-	PORCENTAGEM DE HEMÓLISE PROVOCADA POR DIFERENTES DILUIÇÕES DE POOL DE SORO HUMANO (n = 3).....	98
TABELA 3-	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50 % DE HEMÓLISE INDUZIDA PELA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO DOS EXTRATOS DE <i>M. x paradisiaca</i> E HEPARINA.....	99
TABELA 4-	VALORES MÉDIOS DE GLICEMIA E PESO CORPORAL DOS GRUPOS NO INÍCIO DO EXPERIMENTO.....	105

LISTA DE SIGLAS

AGEs	- Produtos finais da glicação avançada (<i>Advanced glycation end-products</i>)
ANOVA	- Análise de variância
ASC	- Área sob a curva
C1INH	- Inibidor de C1
CL	- Cromatografia líquida
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CR1	- Receptor de complemento tipo 1 (<i>Complement receptor type 1</i>)
CV	- Coeficiente de variação
D	- Diabético
DAD	- Detector de arranjo de diodos
DAF	- Fator de aceleração do decaimento (<i>Decay accelerating fator</i>)
DEAB	- Diabético tratado com extrato aquoso da bráctea
DEAF	- Diabético tratado com extrato aquoso da flor
DFMB	- Diabético tratado com fração metanólica da bráctea
DFMF	- Diabético tratado com fração metanólica da flor
DINS	- Diabético tratado com insulina
DM	- Diabetes mellitus
DM1	- Diabetes mellitus tipo 1
DM2	- Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DP	- Desvio padrão
Dp-CA	- Diabético tratado com ácido <i>p</i> -cumárico
DPR	- Desvio padrão relativo
EAB	- Extrato aquoso da bráctea
EAF	- Extrato aquoso da flor
EAG	- Equivalente em ácido gálico
EEB	- Extrato hidroetanólico (50 %, v/v) da bráctea
EEF	- Extrato hidroetanólico (50 %, v/v) da flor
EM	- Espectrometria de massas
EM/EM	- Espectrometria de massas <i>tandem</i> ou sequencial
ESI	- Ionização por <i>electrospray</i>
FMB	- Fração metanólica da bráctea
FMF	- Fração metanólica da flor
FT-ICR	- Ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
HDL	- Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
HE	- Hematoxilina-eosina
ICH ₅₀	- Concentração de amostra que provoca 50 % de inibição da lise de hemácias
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low density lipoprotein</i>)
IT	- Captura de íons (<i>ion trap</i>)
MAC	- Complexo de ataque a membrana (<i>Membrane attack complex</i>)
MBL	- Lectina ligadora de manose (<i>Mannan-binding lectin</i>)
<i>m/z</i>	- Razão massa/carga
N	- Normal

PTFE	- Politetrafluoretileno
PRISMA	- Principais Itens para Relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises (<i>Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses</i>)
PTP 1B	- Proteína tirosina fosfatase 1B (<i>Protein-tyrosine phosphatase 1B</i>)
Q	- Quadrupolo
QqTOF	- Quadrupolo-tempo de voo
STZ	- Estreptozotocina
HÁ	- HEPES da via alternativa
HC	- HEPES da via clássica
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TOF	- Tempo de voo (<i>Time-of-flight</i>)
TTGO	- Teste de tolerância à glicose oral
UFLC	- Cromatógrafo líquido ultrarrápido (<i>Ultra-fast Liquid chromatography</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVO GERAL	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	<i>Musa x paradisiaca</i>	19
2.1.1	Aspectos econômicos	21
2.1.2	Uso tradicional e atividades farmacológicas da inflorescência de <i>Musa</i> spp	21
2.1.3	Metabólitos identificados em extratos de <i>Musa</i> spp	24
2.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS	26
2.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DE MISTURAS	29
2.3.1	Tipos de planejamento experimental	31
2.3.1.1	Planejamento em rede simplex (Simplex lattice design)	31
2.3.1.2	Planejamento centroide simplex (Simplex-centroid design)	32
2.3.2	Metodologia de superfícies de resposta	33
2.4	SISTEMA COMPLEMENTO	34
2.4.1	Vias de ativação do sistema complemento	34
2.4.1.1	Via clássica	36
2.4.1.2	Via das lectinas	37
2.4.1.3	Via alternativa	37
2.4.1.4	Etapas finais de ativação do complemento	38
2.4.2	Regulação das vias de ativação do complemento	38
2.4.3	Resposta inflamatória na ativação do complemento	39
2.5	DIABETES MELLITUS	40
2.5.1	Modelo animal na investigação do diabetes mellitus	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1	REVISÃO SISTEMÁTICA	44
3.1.1	Estratégia de busca e critérios de seleção	44
3.1.2	Extração de dados e avaliação da qualidade	45
3.2	OBTENÇÃO DA INFLORESCÊNCIA DE <i>M. x paradisiaca</i>	45
3.3	ESTUDO MORFO-ANATÔMICO	46
3.4	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	47
3.4.1	Pesquisa de alcaloides	47
3.4.2	Pesquisa de flavonoides	48
3.4.3	Pesquisa de antraquinonas	48
3.4.4	Pesquisa de taninos	49
3.4.5	Pesquisa de saponinas	50
3.5	AVALIAÇÃO DE SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FLORES E BRÁCTEAS	50
3.5.1	Determinação de compostos fenólicos totais	51
3.6	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	52
3.6.1	Preparo dos extratos aquosos, metanólicos, hidroetanólicos e em acetona de flores e brácteas	52
3.6.2	Procedimento de remoção de açúcares dos extratos aquosos de flores e brácteas	53

3.7	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DOS EXTRATOS.....	54
3.7.1	Identificação dos constituintes dos extratos aquosos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos a espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM).....	54
3.7.2	Comparação da composição química dos extratos aquosos, metanólicos, hidroetanólicos e em acetona das brácteas e flores por CLAE-DAD-EM.....	55
3.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS AQUOSOS E HIDROETANÓLICOS NA VIA CLÁSSICA E VIA ALTERNATIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	55
3.8.1	Preparo das suspensões de hemácias de carneiro.....	56
3.8.2	Preparo das suspensões de hemácias de coelho.....	56
3.8.3	Obtenção do soro humano e titulação.....	57
3.8.4	Ensaio hemolítico dos extratos.....	58
3.8.5	Preparo dos extratos e controle positivo de inibição para o ensaio da via clássica e via alternativa.....	58
3.8.6	Ensaio da via clássica.....	59
3.8.7	Ensaio da via alternativa.....	61
3.8.8	Análises estatísticas.....	62
3.9	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSOS NA TOLERÂNCIA A GLICOSE ORAL E NÍVEIS GLICÊMICOS DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.....	63
3.9.1	Preparo dos tratamentos administrados nos animais.....	63
3.9.1.1	Preparo das soluções dos extratos e frações.....	63
3.9.1.2	Preparo da suspensão de ácido <i>p</i> -cumárico.....	64
3.9.1.3	Preparo da insulina.....	64
3.9.2	Cálculo do tamanho amostral.....	64
3.9.3	Delineamento experimental.....	65
3.9.3.1	Indução do diabetes mellitus experimental.....	66
3.9.3.2	Experimento.....	66
3.9.3.2.1	Teste de tolerância à glicose oral (TTGO).....	67
3.9.3.2.2	Eutanásia.....	68
3.9.3.2.3	Coleta de órgãos e análise histológica.....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1	REVISÃO SISTEMÁTICA.....	66
4.1.1	Efeitos antidiabéticos em modelos de diabetes induzido <i>in vivo</i>	74
4.1.2	Inibição da digestão de carboidratos.....	75
4.1.3	Melhora na captação de glicose.....	76
4.1.4	Efeito antidiabético em humanos.....	77
4.1.5	Avaliação da qualidade dos estudos.....	78
4.2	ESTUDO MORFO-ANATÔMICO.....	81
4.3	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA.....	85
4.4	AVALIAÇÃO DE SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FLORES E BRÁCTEAS.....	86
4.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	91
4.5.1	Rendimento dos extratos e frações metanólicas.....	91
4.6	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DOS EXTRATOS.....	92

4.6.1	Identificação dos constituintes dos extratos aquosos e frações de <i>M. x paradisiaca</i> por CLAE-DAD-EM.....	92
4.6.2	Comparação da composição química dos extratos da bráctea e flor de <i>M. x paradisiaca</i> CLAE-DAD-EM.....	96
4.7	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS NA VIA CLÁSSICA E ALTERNATIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO..	97
4.7.1	Titulação do <i>pool</i> de soro humano.....	98
4.7.2	Ensaio hemolítico dos extratos.....	98
4.7.3	Avaliação do efeito dos extratos aquosos e frações de brácteas e flores na imunomodulação da via clássica do sistema complemento.....	99
4.7.4	Avaliação do efeito dos extratos aquosos e frações de brácteas e flores na imunomodulação da via alternativa do sistema complemento..	102
4.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS NA TOLERÂNCIA A GLICOSE ORAL E NÍVEIS GLICÊMICOS DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.....	103
4.8.1	Pareamento dos grupos.....	104
4.8.2	Avaliação da tolerância à glicose oral.....	105
4.9	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS NA HISTOLOGIA DE FÍGADO E RIM DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA.....	111
4.9.1	Histologia do Fígado.....	111
4.9.2	Histologia do Rim.....	113
5	CONCLUSÃO	116
	REFERÊNCIAS	119
	APÊNDICE 1 – ESTRATÉGIA DE BUSCA COMPLETA REALIZADA NO PUBMED	135
	APÊNDICE 2 – JUSTIFICATIVA DA EXCLUSÃO DE ESTUDOS APÓS LEITURA NA ÍNTEGRA	137
	ANEXO 1 – DEPÓSITO DA EXSICATA DE <i>M. x paradisiaca</i>	138
	ANEXO 2 – PARECER DO PROJETO DE PROTOCOLO CEUA/FCF/CAR: 31/2017	139

1 INTRODUÇÃO

A *Musa x paradisiaca*, pertencente à família *Musaceae*, é conhecida mundialmente pelo seu fruto de alto valor nutricional, a banana, a qual está entre as culturas frutíferas mais importantes do mundo. (JAWLA, KUMAR; KHAN, 2012). Em 2015, a produção global de bananas atingiu uma taxa recorde de crescimento, chegando a cerca de 118 milhões de toneladas (FAO, 2018). Em decorrência dessa ampla produção, estima-se que mais de 100 milhões de toneladas de resíduos sejam gerados a cada ano, principalmente folhas, pseudocauls, caules e inflorescências (IBGE, 2013).

Apesar de as folhas, pseudocauls, caules e inflorescências serem consideradas economicamente como resíduo, em muitas culturas a utilização dessas partes na medicina tradicional é uma prática. Sabe-se que as plantas são utilizadas com a finalidade medicinal desde as mais antigas civilizações (DHAMI, 2013). Estima-se que mais de 85 mil espécies de plantas tenham sido documentadas com uso medicinal em todo o mundo (LIU; WANG, 2008).

Espécies do gênero *Musa* são utilizadas para o tratamento de diversas doenças como diarreia, úlceras, dor, inflamação e diabetes mellitus (IMAM; AKTER, 2011; SWATHI, JYOTHI; SRAVANTHI, 2011). A inflorescência, por exemplo, é utilizada para o tratamento de bronquite, na forma de xarope e, para diabetes, pelo consumo das flores cozidas ou na forma de decocto (KUMAR et al., 2012; SENS, 2002).

A atividade terapêutica das plantas é atribuída aos seus compostos bioativos, principalmente os alcaloides, flavonoides, taninos ou compostos fenólicos (EDEOGA, OKWU; MBAEBIE, 2005). Um grande número de compostos pertencentes a essas classes têm sido identificado, porém, muitos ainda permanecem desconhecidos (LIU, 2003). Devido ao potencial benéfico desses compostos à saúde, as pesquisas têm focado na investigação dos metabólitos secundários com atividade farmacológica, visando o uso comercial dessas plantas na forma medicinal (MAHMOOD, NGAH; OMAR, 2011).

Estudos recentes mostraram que as flores da *M. x paradisiaca* apresentam atividades anti-hiperglicemiantes (JAWLA, KUMAR; KHAN, 2012; NISHA; MINI,

2013a), antioxidante (NISHA; MINI, 2014), efeito galactagogo (MAHMOOD, OMAR; NGAH, 2012) e anti-inflamatória . Adicionalmente, compostos como alcaloides, glicosídeos, esteroides, saponinas, taninos, flavonoides e terpenoides foram relatados nas flores em um estudo fitoquímico preliminar (MAHMOOD, NGAH; OMAR, 2011). Também foram identificadas antocianinas, sendo a cianidina-3-rutinosídeo o componente majoritário, ácido gálico e quercetina em inflorescência de *M. x paradisiaca* (NISHA; MINI, 2013a). No entanto, há poucos estudos sobre a composição fitoquímica da inflorescência e sua relação com as atividades farmacológicas.

Nesse contexto, estudos visando contribuir para comprovação do uso etnofarmacológico da inflorescência dessa espécie são de extrema importância para o desenvolvimento e fortalecimento de terapias complementares para o tratamento de doenças.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito imunomodulador e antidiabético dos extratos de flores e brácteas de *M. x paradisiaca*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática sobre a atividade antidiabética das flores e brácteas do gênero *Musa*;
- Realizar um estudo morfo-anatômico das flores e brácteas de *M. x paradisiaca*;
- Avaliar a influência do solvente de extração no teor de compostos fenólicos totais no preparo de extratos das flores e brácteas de *M. x paradisiaca*;
- Identificar os compostos majoritários presentes nesses extratos;
- Avaliar a atividade imunomoduladora *in vitro* desses extratos na via clássica do sistema complemento;

- Avaliar os efeitos dos extratos aquosos na tolerância a glicose oral e níveis glicêmicos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina;
- Avaliar os efeitos dos extratos aquosos em tecido renal e hepático, de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, através de análise histológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Musa x paradisiaca*

As bananeiras (*Musa* spp. L.) são plantas monocotiledôneas pertencentes ao gênero *Musa* (Musaceae), o qual possui uma distribuição que coincide com os trópicos úmidos e regiões subtropicais nas Américas, África e Ásia, estendendo-se para a Europa e Austrália (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007; PERRIER et al., 2011).

A primeira classificação taxonômica do gênero *Musa* foi proposta em 1887 por Sagot (SAGOT, 1887). Entretanto, somente a partir de 1947, um sistema de classificação coerente foi inicialmente proposto por Cheesman, no qual o gênero *Musa* foi dividido em quatro seções baseadas no número de cromossomos e características morfológicas: Eumusa (na qual estão inseridas as bananas comestíveis) e Rhodochlamys (com 11 pares de cromossomos), Australimusa e Callimusa (com 10 pares de cromossomos) (CHEESMAN, 1947a; 1947b; DOLEŽEL; BARTOŠ, 2005; SIMMONDS; WEATHERUP, 1990).

Em 1976, Argent propôs a inclusão de uma outra seção, Ingentimusa, ao gênero *Musa* baseada em uma única espécie (ARGENT, 1976). Mais recentemente, Hakkinen (2013) propôs um rearranjo fundindo a seção Rhodochlamys na seção Eumusa e o renomeou como *Musa*. Além disso, as seções Australimusa e Ingentimusa foram fundidas na seção Callimusa (HÄKKINEN, 2013).

A complexidade do gênero *Musa* não se limita à presença de seções. A evolução dos diversos cultivares de espécies comestíveis existentes ocorreu principalmente no sudeste da Ásia e África subsaariana a partir da hibridação inter ou intraespécies de *M. acuminata* e *M. balbisiana*. Esses híbridos são classificados como a espécie *M. x paradisiaca* L. (Figura 1), a qual possui como sinônimo o termo *M. sapientum* (FERREIRA, 2018).

FIGURA 1 – *Musa x paradisiaca* L.

FONTE: O autor (2015).

Outra forma de classificação dos híbridos é baseada nos níveis de ploidia e nos genomas que eles contêm. No lugar do nome da espécie, um genoma A ou um genoma B deve ser usado mostrando a origem e contribuição das duas espécies (*M. acuminata* e *M. balbisiana*, respectivamente). Os grupos genômicos resultantes foram classificados, então, como AA, AB, AAA, AAB, ABB, AABB, AAAB, ABBB (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955).

Considerando a alta variabilidade desses híbridos, é importante que estudos que contribuam com a caracterização dos cultivares, como estudos morfo-anatômicos, sejam realizados. Apesar da importância, é verificado uma escassez de estudos para as inflorescências desse gênero, indicando uma lacuna nessa área (ABBAS et al., 2015; FINGOLO et al., 2012; OSUJI, 2006).

2.1.1 Aspectos econômicos

A banana é considerada uma das culturas frutíferas mais importantes do mundo. Nos últimos anos, a produção global de bananas atingiu uma taxa de crescimento recorde, de 68,2 milhões de toneladas em 2000 para 117,9 milhões de toneladas em 2015 (FAO, 2018).

Sobre as exportações, em 2013, pelo terceiro ano consecutivo, o comércio mundial da banana foi marcado pelo forte crescimento, as quais ultrapassaram 17 milhões de toneladas. A maior parte dessa expansão foi impulsionada pelo aumento nas exportações pela América Latina e Caribe, com um crescimento de 6,6 % em 2013 (FAO, 2015).

O Brasil possuía em 2014 uma área de 48,27 mil ha destinada à colheita de banana, produzindo 6,95 milhões de toneladas de cachos de banana, dos quais 1,04 milhão foi produzido na região Sul do país (IBGE, 2014b). O estado do Paraná produziu em 2014 283,4 mil toneladas, obtendo um rendimento médio de 24 mil kg/ha (IBGE, 2014a).

A inflorescência, a qual permanece na porção terminal do cacho da fruta, é composta por flores e brácteas, sendo considerada um importante subproduto do cultivo da banana. Estima-se que mais de 100 milhões de toneladas de resíduos sejam gerados a cada ano, devido à produção de banana, principalmente folhas, pseudocaules, caules e inflorescências (IBGE, 2013).

Nesse contexto, o aproveitamento da inflorescência como fonte de compostos bioativos é uma alternativa interessante para a cadeia produtiva em relação ao aumento de lucro como também a redução de geração de resíduos.

2.1.2 Uso tradicional e atividades farmacológicas da inflorescência de *Musa* spp

O uso popular de diferentes partes da banana é relatado para prevenção e tratamento de doenças como diarreia, úlceras, dor, inflamação, hipertensão e diabetes mellitus (IMAM; AKTER, 2011; NIRMALA et al., 2012). Em algumas regiões, por

exemplo, a casca do fruto é conhecida pelas suas propriedades antissépticas e cicatrizantes no tratamento de feridas e de redução de dor e inchaço em picadas de inseto (uso tópico) (PEREIRA; MARASCHIN, 2015). Adicionalmente, o uso como anti-inflamatório e no tratamento de queimaduras é relatado para as folhas da banana (IMAM; AKTER, 2011; QUILEZ, GARCIA; SÁENZ, 2006)

Na medicina tradicional indiana, o consumo do fruto, flor e pseudocaule em algumas preparações (inflorescência cozida ou na forma de decocto) é indicado para o tratamento da diabetes. Além disso, essas partes são utilizadas no tratamento de diarreia e bronquite (na forma de xarope) (KUMAR et al., 2012; PEREIRA; MARASCHIN, 2015; SARKAR et al., 2015; SENS, 2002; SWATHI, JYOTHI; SRAVANTHI, 2011).

Ao longo dos anos, muitos estudos têm sido realizados para investigar os efeitos farmacológicos dessa planta e comprovar o seu uso tradicional. Para as flores têm sido investigado os efeitos galactagogo (MAHMOOD, OMAR; NGAH, 2012), anti-inflamatório (LEE et al., 2011), antioxidante (AHMAD; AFLAB, 1995; CHINA et al., 2011), imunomodulador e anti-hiperglicêmico (JAWLA, KUMAR; KHAN, 2012; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2012a). No Quadro 1 são apresentadas algumas das atividades farmacológicas estudadas para *Musa* spp.

QUADRO 1 – ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS ESTUDADAS PARA *Musa* spp (continua)

Atividade	Parte da planta	Referência
Anabólica e androgênica	Rizoma	YAKUBU et al. (2013)
Anti-helmíntica	Flores e brácteas, folha e pseudocaule	NOGUEIRA et al. (2012)
Anti-inflamatória	Casca do fruto, bráctea, flor e raquis	DIVYA R. S. (2016); LEE et al. (2011) PHUAKLEE, RUANGNOO; ITHARAT (2012); KHONGKHON, RUANGNOO; ITHARAT (2017); RAO (2016)
Antiagregante plaquetária	Pseudocaule e rizoma	KANDASAMY, RAMU; ARADHYA (2016)
Antimicrobiana	Flor, folha, pseudocaule e rizoma	Tin et al. (2015); KARUPPIAH; MUSTAFFA (2013); RAMU, SHIRAHATTI, ZAMEER, LAKKAPA, et al. (2015); KANDASAMY, RAMU; ARADHYA (2016)
Anticâncer	Fruto, casca do fruto, flor, pseudocaule e rizoma	ABOU-ELELLA; MOURAD (2015); TIMSINA; NADUMANE (2014); KANDASAMY, RAMU; ARADHYA (2016) RAMU, SHIRAHATTI, ZAMEER, LAKKAPA, et al. (2015); K et al. (2018)

QUADRO 1 – ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS AVALIADAS PARA *Musa spp* (conclusão)

Atividade	Parte da planta	Referência
Anticoccidiana	Raiz	ANOSA; OKORO (2011)
Anticonvulsivante	Pseudocaule	REDDY et al. (2018)
Antidiabética	Flor, folha, pseudocaule, raiz	ABDURRAZAK et al. (2015); RAMU et al. (2014); NISHA; MINI (2013a); AGUILARA et al. (1998); ADEWOYE; IGE (2013); RAMU, SHIRAHATTI, ZAMEER; PRASAD (2015); ADEWOYE, TAIWO; OLAYIOYE (2009); SUNDARAM; SUBRAMANIAN (2012a)
Antimalárica	Flor	BAGAVAN et al. (2011)
Antiobesidade	Flor	DIVYA R. S. (2016)
Galactagoga	Flor	MAHMOOD, OMAR; NGAH (2012)
Hepatoprotetora	Pseudocaule	DIKSHIT et al. (2011); NIRMALA et al. (2012)
Imunomoduladora	Flor	CORREA et al. (2017)
Larvicida	Flor	BAGAVAN; RAHUMAN (2011)
Trombolítica	Flor, pseudocaule	RAMU, SHIRAHATTI, ZAMEER, LAKKAPA, et al. (2015)

FONTE: O autor (2018).

Dentre as atividades atribuídas a inflorescência, destacam-se as atividades antidiabética, anti-inflamatória e imunomoduladora. Em relação a atividade antidiabética foram observados efeitos anti-hiperglicêmico (ABDURRAZAK et al., 2015; NISHA; MINI, 2013a) e inibidor de enzimas da digestão de carboidratos (AGUILARA et al., 1998; RAMU et al., 2014) para as flores de *Musa spp*.

Estudos recentes mostram que os extratos aquosos de flores (KHONGKHON, RUANGNOO; ITHARAT, 2017; RAO, 2016) e brácteas (KHONGKHON, RUANGNOO; ITHARAT, 2017) de *M. sapientum* apresentam uma atividade inibitória de produção de óxido nítrico em cultura de células RAW 264.7. Em estudo *in vitro*, o extrato aquoso de flores de *M. paradisiaca* exibiu atividade estabilizadora de membrana de eritrócito, de forma dose dependente, equivalente ao controle ácido acetilsalicílico, um anti-inflamatório não esteroide (DIVYA R. S., 2016). No estudo conduzido por Correa et al. (2017), os extratos da inflorescência de *M. paradisiaca* comprimido apresentaram atividade inibidora da via alternativa do sistema complemento, sustentando o uso dessa espécie como anti-inflamatória.

2.1.3 Metabólitos identificados em extratos de *Musa* spp.

As atividades farmacológicas de plantas são atribuídas aos compostos bioativos presentes nos extratos, ou pelo efeito dos compostos de forma isolada ou de forma sinérgica (EDEOGA, OKWU; MBAEBIE, 2005). Dessa forma, a caracterização química e estudos que investiguem a relação dos compostos presentes nos extratos com as atividades biológicas apresentada pela espécie contribuem para elucidação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (MAHMOOD, NGAH; OMAR, 2011).

Alguns compostos têm sido identificados em extratos de *Musa* spp., como antocianinas (KITDAMRONGSONT et al., 2008), ácidos fenólicos (BHASKAR et al., 2012; SHENG et al., 2014), flavononas (GANUGAPATI, BALDWA; LALANI, 2012) e terpenoides (GANUGAPATI, BALDWA; LALANI, 2012).

Nas brácteas foram identificadas antocianinas como delfinidina-3-rutinosideo, cianidina-3-rutinosideo, petunidina-3-rutinosideo, pelargonidina-3-rutinosideo, peonidina-3-rutinosideo e malvidina-3-rutinosideo (KITDAMRONGSONT et al., 2008). Esses compostos têm sido relatados na literatura como potentes inibidores de α -glicosidase (MATSUI et al., 2006). Além disso, as antocianinas estão envolvidas nos mecanismos que contribuem para o aumento da sensibilidade a insulina e redução dos níveis de glicose no sangue, assim como na prevenção de complicações do diabetes (GUO; LING, 2015).

Nas flores foram identificados os seguintes ácidos fenólicos: ácido gálico, catecol, ácido protocatecuico, ácido gentísico, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e epicatequina (BHASKAR et al., 2012; SHENG et al., 2014). Segundo reportado na literatura, o ácido vanílico apresenta um efeito protetor contra a hiperinsulinemia, hiperglicemia e hiperlipidemia em ratos alimentados com dieta hiperlipídica possivelmente através da diminuição da acumulação hepática de ácidos graxos livres e não esterificados (CHANG et al., 2015).

Nos últimos anos, tem sido relatado na literatura que os ácidos fenólicos possuem atividade inibidora de enzimas como a α -amilase e aldose redutase, contribuindo para redução dos níveis glicêmicos e prevenção de complicações (ALIM et al., 2017; TUNDIS, LOIZZO; MENICHINI, 2010). Em um estudo no qual ratos diabéticos foram tratados com ácido *p*-cumárico, este mostrou reduzir os níveis glicêmicos dos animais, estimulou a produção de insulina e reduziu os níveis de colesterol total e triglicerídeos no plasma e nos tecidos renal e hepático (AMALAN et al., 2016).

Em relação aos efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores dos ácidos fenólicos, os resultados do estudo de Pragasam, Venkatesan e Rassol (2013) apontam o ácido *p*-cumárico como um agente imunossupressor potencial, sugerindo seu uso para tratamento de doenças autoimunes.

As flavononas hesperitina e naringenina também são compostos presentes nas flores de *Musa* spp (GANUGAPATI, BALDWA; LALANI, 2012). Compostos pertencentes a classe das flavononas são conhecidos pelo seu alto poder antioxidante (PARHIZ et al., 2015), o qual tem sido proposto como mecanismo de ação no tratamento da diabetes e suas complicações (REN et al., 2016; SHARMA et al., 2015). A hesperitina e seus derivados e a naringenina também apresentam ação anti-inflamatória (AHMAD et al., 2015; YANG et al., 2012)

Martin et al. (2000) isolou das flores de *M. paradisiaca* siringina, álcool benzílico glicosídeo, (6S, 9R)-roseosideo e um novo composto natural, um hemiterpenoide glicosídeo chamado álcool 1,1-dimetilalil β -glicosídeo. Um estudo que isolou a siringina de *Eleutherococcus senticosus* mostra que esse composto tem ação hipoglicemiante em ratos diabéticos induzidos por estreptozocina (STZ) (NIU et al., 2008). Adicionalmente, outros estudos demonstram que a siringina possui ação inibidora de eicosanoides (DIAZ LANZA et al., 2001), antinociceptiva (CHOI et al., 2004), supressora de C₃-convertase da via clássica do sistema complemento e inibidora de fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis fator alpha*, TNF- α) e produção de linfócitos T citotóxicos (CHO et al., 2001). Essas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras têm sido relacionadas à atividade hepatoprotetora (GONG et al., 2014) e ao efeito protetor em lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos (ZHANG et al., 2017) desse composto.

Outros compostos isolados das flores de *M. balbisiana* são compostos triterpenos, os quais foram identificados como 31-norciclolaudenona, cicloartenol e

(24R)-4 α ,24-trimetil-5 α -colesta-8,25(27)-dien-3 β -ol (TIN et al., 2016). Muitos triterpenoides têm apresentado propriedades antidiabéticas promissoras, podendo citar-se a inibição das enzimas α -glicosidase e α -amilase, inibição da proteína tirosina fosfatase 1B (*protein-tyrosine phosphatase* 1B, PTP 1B) e inibição de produtos finais da glicação avançada (*advanced glycation end-products* – AGEs) (NAZARUK; BORZYM-KLUCZYK, 2015), além de propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva (CHEN et al., 2014; HAIDER et al., 2013; LOZA-MEJIA; SALAZAR, 2015).

Nesse contexto, pode-se destacar que os compostos previamente identificados na inflorescência do gênero *Musa* estão envolvidos em mecanismos anti-inflamatórios e antidiabéticos. Dessa forma, conhecer os compostos presentes nos extratos que serão avaliados contribui para uma melhor compreensão do uso popular e dos efeitos observados nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Portanto, ao se estudar atividades biológicas de produtos naturais, é imprescindível a caracterização química dos extratos sob investigação através de técnicas analíticas.

2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS NA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS

Atualmente, no cenário de desenvolvimento de novos fitoterápicos, um dos principais desafios é a busca dos compostos bioativos, ou seja, a identificação daqueles que são responsáveis pela ação farmacológica dos extratos vegetais. Entretanto, a análise de metabólitos secundários em plantas é um desafio, pois são quimicamente diversificados, geralmente em baixa abundância e alta variabilidade mesmo quando avaliados dentro da mesma espécie. Dessa forma, é necessário o emprego de técnicas analíticas altamente sensíveis e seletivas, que permitam uma adequada identificação (STEINMANN; GANZERA, 2011).

A hifenação da cromatografia líquida a espectrometria de massas tem sido bastante selecionada para pesquisa de produtos naturais pela identificação da massa molecular de compostos em baixas concentrações, exigindo pequenos volumes de amostra (KUMAR, 2017).

A cromatografia líquida (CL) é uma técnica que pode ser aplicada aos mais diferentes tipos de amostras, incluindo a análise de matrizes complexas como os extratos de planta. Essa técnica permite separar e quantificar de forma eficiente os compostos presentes através da interação diferencial dos componentes da matriz entre a fase móvel e fase estacionária (MALDANER; JARDIM, 2009).

A CL pode ser aplicada tanto para estimativa qualitativa como para quantitativa de uma composição particular de amostras obtidas de fontes naturais. Normalmente, a análise qualitativa é realizada a partir da avaliação dos dados com base na comparação do tempo de retenção dos padrões de referência e dos compostos presentes na amostra. Já a estimativa quantitativa é feita utilizando curva padrão preparada com padrões de referência em diferentes níveis de concentração do analito de interesse (PANG et al., 2016).

Quando acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD), é possível obter o perfil espectral na região do ultravioleta de cada pico cromatográfico, o que fornece informações estruturais mais comuns sobre os metabólitos. Por exemplo, o ácido gálico e o ácido siríngico possuem picos de absorção máxima em 271 e 275 nm, enquanto que os ácidos benzoicos possuem absorção máxima em 246-262 nm. No entanto, a absorção máxima em 280 nm é comum a maioria dos compostos fenólicos, dificultando a identificação dos mesmos por essa técnica (KUMAR, 2017).

Dessa forma, para identificação dos componentes do extrato é necessário muitas vezes informações adicionais, como as fornecidas pela hifenação do LC a espectrometria de massas (EM). A EM é conhecida como uma técnica padrão na caracterização estrutural de moléculas. Basicamente é composta por uma fonte de ionização, um analisador e um detector (STEINMANN; GANZERA, 2011). As moléculas de interesse são introduzidas na fonte de ionização, onde irão adquirir cargas positivas ou negativas. As moléculas carregadas são então conduzidas pelo analisador e chegam ao detector de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Os sinais gerados no detector são exibidos graficamente como um espectro de massa mostrando a abundância relativa dos sinais de acordo com sua relação m/z (HO et al., 2003).

A fonte de ionização por *electrospray* (ESI) é amplamente utilizada na análise de compostos naturais, pois é uma técnica branda de ionização e permite a hifenação do CL com o EM, fazendo a interface entre as técnicas (HO et al., 2003). Dentre os tipos de analisadores, pode-se destacar o quadrupolo (Q), tempo de voo (*time-of-flight*,

TOF), captura de íons (*ion trap*, IT) e ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR), os quais podem ser hifenados a CL. De forma a se obter informações sobre a estrutura da molécula, é comum a utilização do acoplamento de analisadores, conhecida como EM *tandem* (EM/EM). Nesse caso, dois experimentos são realizados em sequência, onde os íons selecionados em um primeiro experimento são fragmentados no segundo, fornecendo, então, maiores informações estruturais, o que é muito aplicado a identificação e caracterização de compostos naturais. Além disso, a EM/EM pode ser utilizada para aumentar a sensibilidade e seletividade nas análises quantitativas (WU et al., 2013).

A escolha entre os tipos de analisadores dependerá do propósito da análise. Para as análises de identificação de produtos naturais e seus metabólitos é preferível a escolha de analisadores de alta resolução de massa. O Q-TOF é um exemplo, o qual pode atingir exatidão de massas em partes por milhão, ou até abaixo disso, além de fornecer informações sobre a fragmentação dos íons sob investigação (KIND; FIEHN, 2010).

Dessa forma, quando utilizado a hifenação dessas técnicas, as informações de massa molecular com exatidão e de perfil de fragmentação fornecidas, perfil de absorção na região do ultravioleta e tempo de retenção podem ser avaliadas em conjunto, contribuindo para a elucidação e identificação de compostos de interesse.

Uma vez identificados os compostos presentes nos extratos, pode-se pensar em otimizar a extração dos mesmos. Uma das formas é avaliar o emprego de diferentes solventes durante o preparo, já que o solvente é uma variável que influencia diretamente na etapa de extração, ou seja, ele determina as classes que serão majoritariamente extraídas, assim como a concentração dos metabólitos que será obtida na composição final. O planejamento experimental para o estudo de misturas é uma ferramenta que pode ser utilizada para essa etapa de avaliação. Nos últimos anos, essa ferramenta tem sido muito empregada na otimização do preparo de extratos vegetais visando uma melhor obtenção dos compostos de interesse (JENTZER et al., 2015; MORAES et al., 2016; PASSARI, SCARMINIO; BRUNS, 2014).

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DE MISTURAS

De forma a se avaliar como diferentes solventes e suas misturas influenciam na variação da extração de compostos de interesse, como, por exemplo, compostos fenólicos, pode-se utilizar um planejamento de experimentos. Nesse caso, a realização de um número limitado de experimentos previamente selecionados permite identificar quais as proporções de cada componente que influenciam a resposta. A partir dessas respostas obtidas gera-se uma superfície de resposta, sendo possível, então, estimar as propriedades de um sistema multicomponente (NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Em experimentos para o estudo de misturas (dois ou mais componentes), as respostas estudadas dependem da proporção desses componentes, e não da quantidade final da mistura (SCHEFFÉ, 1958). Portanto, a soma dos componentes da mistura é sempre cem por cento, ou seja, em uma mistura de q componentes, tem-se:

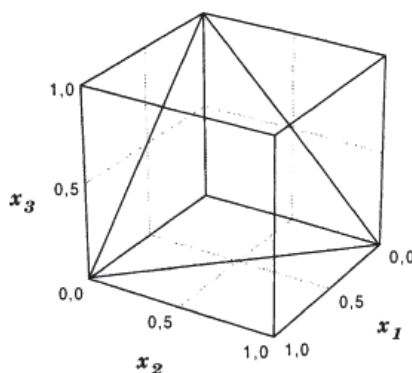
$$\sum_{i=1}^q x_i = 100 \% = 1 \quad (1)$$

Sendo que x_i corresponde a proporção do i -ésimo componente.

Considerando que as proporções devem obedecer a esta equação, para se definir a composição da mistura a ser avaliada é necessário que se fixe apenas $1-q$ componentes, sendo que o último componente sempre assumirá o valor restante para se atingir 100 %. Assim, a expressão espacial da mistura, denominada de simplex, tem uma dimensão a menos que o número de componentes. No caso de uma mistura binária, a equação (1) reduz-se a $x_1 + x_2 = 1$, sendo expressa espacialmente como uma reta. Já para misturas de três componentes, a Equação (1) seria $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, sendo expressa como um triângulo equilátero. Os vértices do triângulo correspondem aos componentes puros, os lados, às misturas binárias e os pontos

localizados no interior do triângulo, às misturas dos três componentes (NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2001; SCHEFFÉ, 1958) (Figura 2).

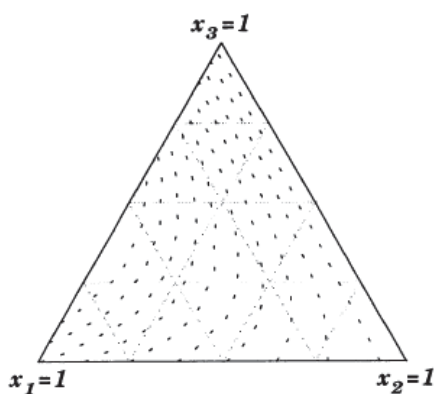
FIGURA 2 – ESPAÇO EXPERIMENTAL PARA TRÊS VARIÁVEIS: A MISTURA DOS TRÊS COMPONENTES LIMITA-SE AOS PONTOS PERTENCENTES AO TRIÂNGULO



FONTE: Wang e Fang (2010).

A partir das respostas obtidas para cada proporção de componentes avaliada é construída uma superfície de resposta. Esta é desenhada acima do triângulo e descreve a variação de uma determinada propriedade com a composição da mistura (NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2001; SCHEFFÉ, 1958). A representação dessa superfície por suas curvas de nível gera um diagrama triangular, conforme Figura 3.

FIGURA 3 – CURVAS DE NÍVEL DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA TRÊS VARIÁVEIS



FONTE: Wang e Fang (2010).

Os pontos escolhidos para compor o planejamento experimental são montados, então, dentro do simplex e permitem a estimativa de modelos matemáticos que irão representar o comportamento da mistura em todo o espaço experimental.

Portanto, as respostas obtidas com os experimentos devem tornar possível o ajuste da equação de regressão para a superfície de resposta. Vários tipos de planejamentos são conhecidos e os mais utilizados para mistura são o planejamento em rede simplex e o centroide simplex.

2.3.1 Tipos de planejamento experimental

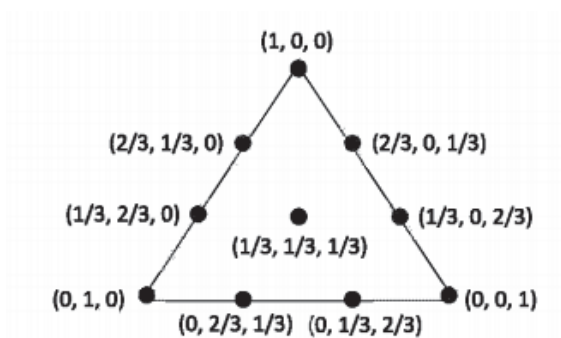
2.3.1.1 Planejamento em rede simplex (Simplex lattice design)

O planejamento em rede simplex, desenvolvido por Scheffé (1958), é um planejamento no qual os pontos estão distribuídos uniformemente no simplex. Esse delineamento é descrito como $\{m, q\}$, no qual q é o número de componentes da mistura e m , o grau do polinômio a ser ajustado. As proporções dos componentes da mistura resultam em um número de pontos segundo a equação $(m + 1)$, simetricamente espaçados de zero até um. O cálculo do número total de experimentos é dado pela equação 2.

$$C_{q+m+1}^m = \frac{(q+m+1)!}{m!(q-1)!} \quad (2)$$

Por exemplo, para uma mistura de três componentes, o qual é expresso espacialmente por um triângulo equilátero, e supondo que cada componente assumirá as seguintes proporções: zero, um terço, dois terços e um (0, 1/3, 2/3 e 1), o número total de experimentos será igual a 10 (Figura 4).

FIGURA 4 – PLANEJAMENTO EM REDE SIMPLEX {3,3}



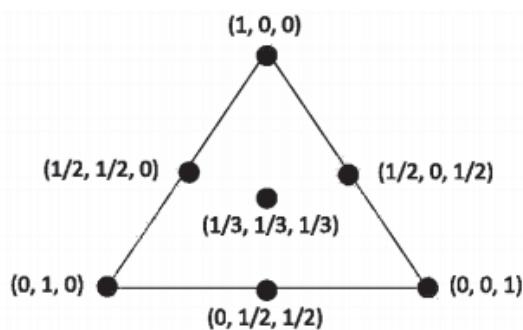
FONTE: O autor (2018).

2.3.1.2 Planejamento centroide simplex (Simplex-centroid design)

No delineamento experimental centroide simplex, desenvolvido por Scheffé (1963), as observações consideram todos os subconjuntos dos q componentes. No entanto, utilizam-se apenas as misturas contendo proporções iguais desses componentes, totalizando um número de observações igual a $2^q - 1$. O número de observações é, então, reduzido, além de permitir o ajuste do modelo cúbico espacial.

Assim, para uma mistura de três componentes ($q = 3$), a expressão espacial também será o triângulo equilátero e para que cada componente se encontre na mesma proporção, deverão assumir as seguintes proporções: zero, um meio, um terço e um (0, 1/2, 1/3, e 1), totalizando sete experimentos (Figura 5).

FIGURA 5 – PLANEJAMENTO CENTROIDE SIMPLEX



FONTE: O autor (2018).

2.3.2 Metodologia de superfícies de resposta

A metodologia de superfícies de respostas é uma técnica de otimização normalmente utilizada em processos industriais, que foi introduzida por Box e Wilson (1951). Tem como finalidade construir um modelo funcional de relação entre a resposta de interesse e as variáveis independentes, representando o comportamento do sistema de misturas e permitindo analisar como e quanto cada variável influencia na resposta (BOX; WILSON, 1951).

No caso específico de experimentos de misturas, os modelos utilizados são os polinômios de Scheffé. A modelagem é feita ajustando-se modelos como linear, quadrático, cúbico especial ou cúbico completo aos dados obtidos do planejamento experimental (NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2001; SCHEFFÉ, 1958). A partir dos modelos ajustados, são obtidos as equações de regressão e os coeficientes pelo método dos mínimos quadrados, além da determinação dos erros.

Uma etapa importante é a avaliação da adequação do modelo escolhido para representar a resposta. Uma das formas de se avaliar a adequação é analisar a significância estatística do modelo - análise de variância (ANOVA), que permite identificar quais modelos se ajustam aos dados, e o teste de falta de ajuste, calculado quando existem observações repetidas, o qual possibilita julgar se o modelo apresenta número de observações satisfatório ou se é necessário a adição de outros termos ao modelo. Os gráficos de resíduos também contribuem para o julgamento da adequação do modelo, sendo utilizados para detectar desvios de consideração de normalidade do erro experimental e pontos fora da tendência (*outliers*) (NETO, SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Dessa forma, a partir da construção das superfícies de resposta, é possível escolher a mistura que proporciona uma melhor extração dos compostos de interesse. Sendo assim, após a obtenção dos extratos, é possível estudar os efeitos biológicos dos mesmos utilizando-se modelos *in vitro* e *in vivo*.

Uma vez que estudos reportados a literatura indicam que as flores do gênero *Musa* possuem efeitos antidiabético e anti-inflamatório, torna-se interessante a aplicação desses extratos em modelos que contribuam na investigação dessas atividades biológicas.

2.4 SISTEMA COMPLEMENTO

O complemento é parte do sistema imune inato e um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral. O sistema complemento foi descoberto pela primeira vez na década de 1890. O nome “complemento” foi adotado baseando-se nas observações de Jules Bordet, o qual mostrou através de experimentos que os componentes desse sistema auxiliam ou complementam a função lítica dos anticorpos (CARROLL, 2008).

Esses componentes são proteínas séricas e proteínas associadas a membrana celular que, quando ativadas, interagem entre si e com outras moléculas do sistema imune de forma altamente regulada, levando a uma cascata sequencial de reações enzimáticas (vias de ativação). Essa ativação resulta na produção de anafilatoxinas que induzem respostas fisiológicas que variam desde quimioatração a apoptose celular (SARMA; WARD, 2011).

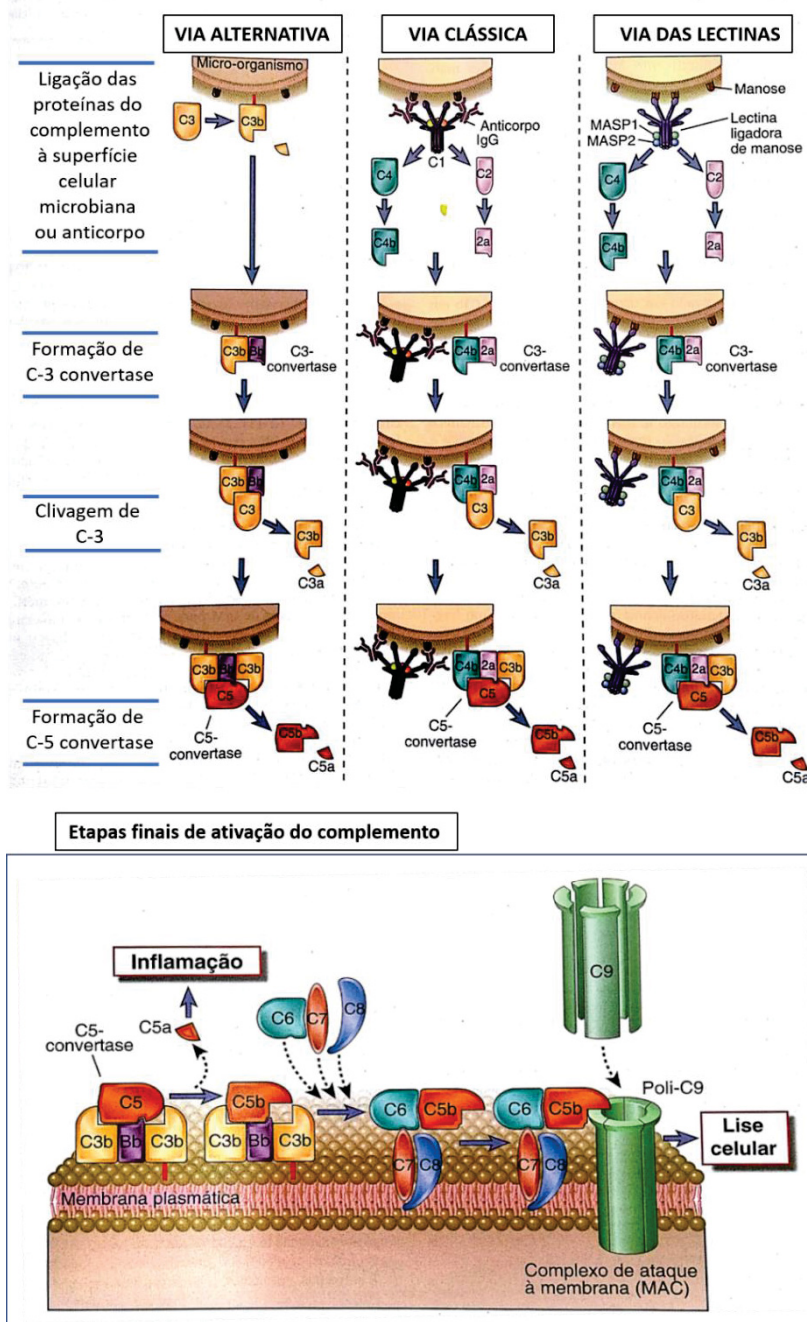
Essas respostas fisiológicas têm como objetivo eliminar o microrganismo. Dessa forma, o complemento promove durante uma infecção o estímulo da inflamação, opsonização, fagocitose e destruição do patógeno, ativando a resposta imune adaptativa. Portanto, tanto uma ação ineficiente como uma estimulação além do necessário do complemento pode ser prejudicial ao hospedeiro, estando associada a susceptibilidade a infecções ou a doenças autoimunes, inflamações crônicas, rejeição de enxertos, entre outros (LI et al., 2015; MERLE et al., 2015).

2.4.1 Vias de ativação do sistema complemento

As vias de ativação do sistema complemento são três: 1) via clássica, a qual é ativada pela presença do complexo antígeno-anticorpo; 2) via alternativa, que é ativada pela presença de bactérias, fungos, vírus, células tumorais (sem a presença de anticorpo); 3) via das lectinas, a qual é ativada pela ligação de polissacarídeos

presentes na superfície dos microrganismos (ex. manose) às lectinas circulantes. Todas as vias convergem em C3, a qual é a proteína complemento mais abundante encontrada no sangue, resultando na formação dos produtos de ativação, C3a, C3b, C5a e complexo de ataque à membrana (MAC – *membrane attack complex*) (C5b-9). O esquema das etapas de ativação do complemento é apresentado na Figura 6.

FIGURA 6 – ETAPAS INICIAIS E FINAIS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO PELAS VIAS CLÁSSICA, ALTERNATIVA E DAS LECTINAS E ETAPAS FINAIS COM FORMAÇÃO DO MAC



FONTE: Adaptado de Abbas, Lichtman e Pillai (2012).

2.4.1.1 Via clássica

A via clássica é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo, o qual pode estar solúvel, depositado na matriz extracelular ou fixados sobre a superfície celular. Primeiramente ocorre a ligação da proteína do complemento C1 ao anticorpo complexado ao antígeno. A proteína C1 é um complexo formado por subunidades C1q, C1r e C1s. C1r e C1s são proteases, enquanto que C1q é a subunidade que se liga ao anticorpo, ou seja, que faz o reconhecimento da molécula e se liga às regiões específicas da fração Fc da imunoglobulina (SARMA; WARD, 2011).

Os locais de ligação de C1q das moléculas de imunoglobulina M (IgM) estão normalmente ocultos. No entanto, após a ligação da IgM ao antígeno, ocorre uma mudança conformacional, expondo esses sítios de ligação, permitindo que até duas moléculas de C1q se liguem a uma molécula de IgM. Já nas moléculas de imunoglobulina G (IgG) há apenas um sítio de ligação e este está exposto. Nesse caso, a intensidade de ativação da via clássica dependerá da distribuição do epítipo do antígeno e da densidade da ligação de IgG (MERLE et al., 2015). Por isso, a IgM é considerada um fixador do complemento mais eficiente que a IgG.

Uma vez que duas ou mais moléculas de C1q estão ligadas às frações Fc das IgG, ocorre a ativação de C1r, que ativa C1s. C1s cliva a próxima proteína da cascata, C4, gerando C4b, que se liga à superfície antigênica do anticorpo, e C4a, que é liberada. A proteína seguinte C2 se liga ao C4b, sendo clivada por C1s em C2a e C2b (solúvel), formando o complexo C4b2a, que é a C3-convertase. A C3-convertase cliva C3 em C3a e C3b, sendo que a última se liga a C4b2a, formando o complexo C4b2a3b, que é a C5-convertase (LI et al., 2015). C3b atua como opsonina, promovendo a fagocitose pela ligação específica a receptores de neutrófilos e macrófagos e amplificando a ativação do sistema complemento (SARMA; WARD, 2011).

2.4.1.2 Via das lectinas

Essa via de ativação do sistema complemento ocorre mediante reconhecimento de polissacarídeos na superfície de patógenos pelas lectinas circulantes, como a lectina ligadora de manose (MBL – *mannan-binding lectin*) ou as ficolinas. Associadas a uma molécula de MBL estão duas serina-proteases, formando os complexos MASP-1 a MASP-4, os quais possuem papel equivalente ao complexo C1 na via clássica. A ligação ao patógeno faz com que haja uma mudança conformacional em MASP-2, a qual irá clivar C4 em C4a e C4b. Da mesma forma como ocorre na via clássica, C4b se adere à superfície do patógeno ativando a clivagem de C2 em C2a e C2b. A formação de C4b2a, C3-convertase e, na sequência, a C5-convertase (SARMA; WARD, 2011).

2.4.1.3 Via alternativa

No plasma, em condições fisiológicas normais, a via alternativa é auto ativada, ou seja, constantemente há a hidrólise de C3 formando C3(H₂O), uma forma ativada dessa proteína. Essa forma expõe um sítio de ligação para o fator que, ao se ligar, é clivado por uma serinoprotease denominada fator D em dois fragmentos: Ba e Bb. O fragmento Bb combinado a C3(H₂O), C3(H₂O)Bb, é uma C3-convertase, a qual cliva C3 mantendo, então, níveis basais circulantes de C3b (LI et al., 2015).

Alguns agentes como microrganismos possuem a capacidade de ativar a via alternativa. O C3b adere-se à superfície celular, o fator B liga-se à C3b, o qual é clivado pelo fator D, gerando o fragmento Bb que permanece ligado a C3b, formando o complexo C3bBb, uma C3-convertase. A properdina, uma outra proteína da via alternativa, se liga a esse complexo estabilizando-o. Dessa forma, mais moléculas de C3 são clivadas, ou seja, ocorre uma amplificação de ativação dessa via. O C3b formado pelas vias clássica e das lectinas também podem formar o complexo com Bb, clivando mais C3 (WALPORT, 2001).

As moléculas C3b formadas se ligam a própria convertase, formando a C3bBb3b, uma C5-convertase. Sendo assim, essa via, assim como a clássica e a das lectinas, leva a clivagem de C5 e às etapas finais da ativação do complemento (MERLE et al., 2015).

2.4.1.4 Etapas finais da ativação do complemento

As C5-convertases formadas na via clássica das lectinas e alternativa clivam C5 em C5a e C5b. O fragmento C5b recruta e se liga às proteínas subsequentes da cascata C6, C7 e C8. Essas proteínas são inseridas na membrana plasmática e, na sequência, moléculas de C9 se polimerizam ao redor formando o MAC (C5b-9), promovendo a formação de poros e lise celular (MERLE et al., 2015).

2.4.2 Regulação das vias de ativação do complemento

Considerando a multiplicidade de efeitos que o complemento pode exercer quando ativado, é necessário que haja um equilíbrio entre sua ativação e inibição, de modo a prevenir lesão em células e tecidos próprios. Algumas proteínas livres e proteínas ligadas à membrana com funções específicas estão envolvidas nessa regulação da cascata (SARMA; WARD, 2011).

Dentre as proteínas livres, por exemplo, pode-se citar as carboxipeptidases plasmáticas, que inibem a ação de C3a e C5a, removendo o resíduo de arginina terminal. Isso reduz a atividade pró-inflamatória dessas anafilatoxinas. Também a proteína de ligação a C4 (C4BP) (para C4b) e o Fator H (para C3b) atuam acelerando a degradação das C3-convertases na via clássica e alternativa, respectivamente. A serino-protease inibidor de C1 (C1INH) inibe a atividade de C1r e C1s (via clássica) e a MASP-1 e MASP-2 associadas a MBL (via das lectinas). Indivíduos que possuem uma mutação no gene que produz a C1INH apresentam o quadro clínico de

angioedema hereditário, decorrente da deficiência da mesma (WAGNER; FRANK, 2009).

Outra forma de regulação negativa da cascata é pela ação das proteínas ligadas à membrana. A inativação de C3b e C4b por clivagem proteolítica é promovida pelo Fator I na presença de cofatores como proteína cofator de membrana (MCP – *membrane cofactor protein*) e receptor de complemento tipo 1 – CR1 (*complement receptor type 1*) (CD35), além do Fator H. O CR1 se liga a C3b dos imunocomplexos, promovendo sua fagocitose. Dessa forma, a falha na ação de CR1 está relacionada a dano tecidual pelo acúmulo desses imunocomplexos (MERLE et al., 2015).

As membranas celulares são preservadas também pela expressão do fator de aceleração do decaimento (DAF – *decay accelerating factor*), o qual acelera a degradação das C3-convertases nas três vias de ativação do complemento. Em relação a regulação das etapas finais de ativação, tem-se a CD59, proteína que impede a polimerização de C9, inibindo a formação do MAC e, conseqüentemente, lise celular. Um defeito na expressão de DAF e CD59 em eritrócitos está relacionado a um tipo de anemia hemolítica crônica conhecida como hemoglobinúria paroxística noturna, na qual há o aumento de susceptibilidade dos eritrócitos ao complemento (SARMA; WARD, 2011).

2.4.3 Resposta inflamatória na ativação do complemento

O sistema complemento não apenas está envolvido na defesa do hospedeiro para erradicar patógenos, mas desempenha um papel crítico na resposta inflamatória (GUO; WARD, 2005). A ativação do complemento está relacionada a muitas doenças inflamatórias agudas e crônicas, incluindo a lesão de isquemia-reperfusão (CASTELLANO et al., 2018), sepse (FATTAHI et al., 2018), asma (LAUMONNIER et al., 2017) e lesão pulmonar aguda (WANG et al., 2015).

Durante a ativação do complemento, os fragmentos C3a e C5a, anafilatoxinas, são constantemente liberados. Esses fragmentos se ligam a receptores em mastócitos e basófilos levando a liberação de histamina, promovendo vasodilatação. Além disso, promovem o recrutamento de células fagocitárias como

neutrófilos e monócitos para o sítio da ativação do complemento (SARMA; WARD, 2011). A C5a estimula a motilidade e adesão de neutrófilos a células endoteliais e a liberação de espécies reativas de oxigênio. Também aumenta a permeabilidade do endotélio vascular e a expressão de receptores para neutrófilos agindo diretamente em receptores nesse tecido. Além disso, a C5a recruta células T e células supressoras mielóides (MERLE et al., 2015).

Os mecanismos de ação de C3a parecem ser mais complexos. Estudos têm mostrado que C3a não apresenta apenas papel pró-inflamatório, mas também anti-inflamatório em algumas situações. Na inflamação aguda, por exemplo, C3a previne o recrutamento de neutrófilos e o acúmulo desses, reduzindo a inflamação tecidual. Já na asma e artrite reumatóide está relacionada a progressão da doença, possuindo um papel pró-inflamatório (COULTHARD; WOODRUFF, 2015).

2.5 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia decorrente da drástica redução na produção de insulina pelas células beta do pâncreas (diabetes mellitus tipo 1 – DM1) e/ou resistência tecidual à insulina (diabetes mellitus tipo 2 – DM2), levando ao desenvolvimento de complicações de saúde debilitantes e potencialmente fatais. A hiperglicemia é um dos sintomas mais comuns do diabetes mellitus descontrolado e esta condição está associada a complicações cardiovasculares e microvasculares, levando ao aumento da mortalidade e da morbidade. Portanto, o diabetes também tem um impacto econômico substancial nos sistemas de saúde, devido ao aumento do uso de serviços de saúde, aumento da perda de produtividade ou incapacidade de trabalhar devido a complicações relacionadas ao diabetes (ALTABAS, 2015; HUANG et al., 2014; LIU et al., 2010).

O número de pessoas com DM aumentou significativamente ao longo dos anos, aumentando de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014 (ADA, 2015). Estimativas atuais sugerem que 642 milhões de pessoas desenvolverão diabetes mellitus até 2040, afetando um em cada 10 adultos em todo o mundo (IDF, 2015).

Esse aumento está relacionado principalmente ao DM2, principalmente devido ao envelhecimento da população e ao notável aumento do número de pessoas com excesso de peso, obesidade ou pela inatividade física (ADA, 2015).

Para pacientes com DM2, a estratégia para o tratamento depende do estágio da doença e das características individuais dos pacientes diabéticos, principalmente condições clínicas e resposta do paciente. Por muitos anos, a terapia foi baseada em duas classes de fármacos, sulfoniluréias e biguanidas. Todavia, a melhora na compreensão dos mecanismos do DM2 facilitou o desenvolvimento de classes de fármacos que visam vias metabólicas específicas, como tiazolidinedionas, inibidores da dipeptidil peptidase-4, inibidores do cotransportador sódio-glicose tipo 2 e agonistas do peptídeo 1 semelhantes ao glucagon (FAKHRUDIN et al., 2010).

Apesar do arsenal de medicamentos antidiabéticos disponíveis, o controle adequado da doença e suas complicações ainda não foi alcançado. Na deficiência de uma terapia farmacológica ideal para aliviar as complicações primárias e secundárias do diabetes, é necessário continuar a busca de novas terapias que sejam mais efetivas com menos efeitos adversos (ADA, 2015; HANDELSMAN et al., 2015).

A fitoterapia é uma importante alternativa no tratamento complementar de diversas doenças. Além disso, muitos fármacos utilizados atualmente foram descobertos a partir do uso tradicional de plantas medicinais. Muitas plantas medicinais e suas preparações têm sido utilizadas pela população para o tratamento da DM. No entanto, é fundamental que pesquisas que avaliem o potencial terapêutico dessas plantas e preparações sejam desenvolvidas de forma a fortalecer as evidências e contribuir para a produção de um medicamento fitoterápico. O uso de modelo animal para a investigação da atividade farmacológica de interesse é uma forma de gerar informações em relação ao potencial das plantas medicinais.

2.5.1 Modelo animal na investigação do diabetes mellitus

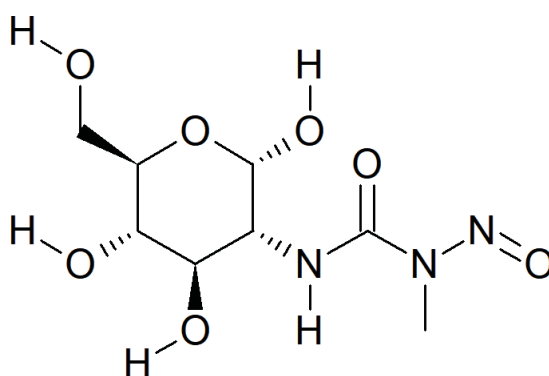
Os modelos animais são frequentemente utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos no estabelecimento das complicações do DM, bem como utilizados para identificar e selecionar novos tratamentos para esta síndrome (SINGH;

PATHAK, 2015). O DM experimental pode ser induzido de diferentes maneiras: administração de fármacos (DEY et al., 2015; YAZGAN et al., 2015); manipulação cirúrgica, imunológica ou genética (MAZO et al., 2014); imposição de dietas hiperlipídicas ou hipercalóricas (WHITE et al., 2013). Os procedimentos são aplicados em diversas espécies animais, sendo a maioria a de roedores.

Um dos modelos experimentais que tem sido amplamente utilizado é a indução química pela administração de fármacos diabetogênicos em roedores, como a estreptozotocina (STZ), uma vez que mimetiza as complicações metabólicas observadas no indivíduo diabético (ELEAZU et al., 2013).

A STZ (Figura 7), uma glicosamina-nitrosureia, é captada pelas células beta pancreáticas via transportador GLUT-2, promovendo a destruição dessas células e produzindo, assim, um estado de hiperglicemia em alguns dias após a administração (KING; BOWE, 2016). São três os principais mecanismos apontados para citotoxicidade desse composto: alquilação de DNA, a qual leva a ativação de poli-ADP ribose polimerase (como mecanismo de reparação de dano ao DNA) e depleção de NAD⁺, reduzindo os níveis de ATP e, posteriormente, inibindo a síntese e secreção de insulina (RADENKOVIĆ, STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016); produção de óxido nítrico; e geração de radicais livres (ELEAZU et al., 2013).

FIGURA 7 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ESTREPTOZOTOCINA (STZ)



FONTE: O autor (2018).

Por destruir as células beta pancreáticas e produzir DM insulina-dependente, esse modelo é considerado um modelo de DM1 (KING; BOWE, 2016). No entanto, o modelo tem sido muito empregado para o estudo dos mecanismos de complicações decorrentes do diabetes, como a nefropatia diabética, e como ferramenta de avaliação de novos medicamentos (CHATZIGEORGIOU et al., 2009).

Dessa forma, esse modelo experimental tem sido amplamente utilizado para a investigação de efeitos de extratos e compostos naturais nos diferentes sintomas relacionados ao DM (FLORENCE et al., 2014; GONZALES, GONZALES-CASTANEDA; GASCO, 2013; IGHODARO; AKINLOYE, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

Durante a revisão de literatura, foi observado muitos artigos apontando para atividade antidiabética das flores do gênero *Musa*. Então, com o objetivo de se verificar o potencial antidiabético da inflorescência de *Musa* spp. a partir de estudos já publicados na literatura, foi realizada uma revisão sistemática.

A revisão sistemática foi conduzida com base nas recomendações da Colaboração Cochrane e *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (HIGGINS; GREEN, 2011; LIBERATI et al., 2009). Todas as etapas foram realizadas por dois autores de forma independente antes de chegar a um consenso, e as discrepâncias foram resolvidas por um terceiro revisor.

3.1.1 Estratégia de busca e critérios de seleção

A busca foi realizada nas seguintes bases de dados: PubMed, Scopus e *Web of Science* (atualizados em março de 2017). Não foram utilizados filtros para data de publicação ou idioma. A estratégia de busca foi estruturada e construída em torno da pergunta “Quais são os efeitos antidiabéticos avaliados para os extratos de inflorescência de *Musa* spp.?” A estratégia de busca completa para o PubMed é apresentada no Apêndice 1.

Primeiramente, títulos e resumos dos artigos identificados foram revisados de forma independente por dois pesquisadores, de acordo com os critérios de inclusão, a fim de identificar registros irrelevantes. Os critérios de inclusão foram: (1) pertencer ao gênero *Musa*; (2) avaliar pelo menos uma atividade antidiabética *in vitro* ou *in vivo* (em humanos ou animal); e (3) avaliar o extrato de inflorescência (flor ou bráctea). Na segunda etapa, artigos de texto completo foram avaliados de forma independente pelos mesmos pesquisadores considerando os seguintes critérios de exclusão:

estudos que não prepararam extrato (uso de material vegetal fresco - *in natura* - ou planta seca); estudos que avaliaram um extrato contendo uma mistura de várias espécies; ou artigos relatados em caracteres não romanos.

3.1.2 Extração de dados e avaliação da qualidade

Uma vez definidos os artigos que contemplaram os critérios de seleção desta revisão, a próxima etapa foi a extração dos dados. Dados como as características básicas do artigo (nomes dos autores, ano de publicação, país da pesquisa), tipo de extrato, atividade biológica avaliada e métodos de estudo e resultados foram cuidadosamente extraídos pelos dois revisores em uma planilha eletrônica de Excel® e analisados qualitativamente.

O risco de viés nos estudos em animais incluídos nesta revisão sistemática foi avaliado com base na ferramenta SYRCLE's Rob (HOOIJMANS et al., 2014). Para estabelecer o risco de viés, foram analisados os seguintes aspectos: viés de seleção, viés de desempenho, viés de detecção, viés de atrito e viés de relato. Além disso, no estudo realizado em pacientes com diabetes (seres humanos), o risco de viés foi determinado usando a ferramenta de colaboração Cochrane (HIGGINS; GREEN, 2011).

3.2 OBTENÇÃO DA INFLORESCÊNCIA DE *M. x paradisiaca*

As inflorescências de *M. x paradisiaca* L. foram coletadas com aproximadamente 60 dias após o crescimento dos frutos, no mês de setembro de 2015, na cidade de Morretes – PR, coordenadas geográficas 25°29'45,59" S e 48°48'40,25" W, 10,93 m. A identificação foi realizada no Herbário do Museu Botânico de Curitiba, onde uma exsicata foi depositada sob o número MBM – 348145 (Anexo 1).

As brácteas e flores foram separadas e secas em estufa com recirculação de ar a 30 °C por 5 dias. Em seguida, o material vegetal foi reduzido em pequenos fragmentos no moinho de faca e tamisado em malha de 3 mm (Polymix PX-MFC 90 D, Kineland, Nova Iorque, EUA). O pó foi armazenado em sacos plásticos com fecho hermético a temperatura ambiente em local seco e protegido da luz.

3.3 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

Considerando os poucos estudos realizados para as inflorescências das espécies do gênero *Musa*, foi realizado um estudo morfo-anatômico das brácteas e flores coletadas no município de Morretes-PR com o objetivo de se determinar características morfo-anatômicas da espécie utilizada nesse trabalho.

De forma a preservar a amostra, o material vegetal (brácteas externas e internas; flores externas, intermediárias e internas) foi colocado em fixador FAA₅₀ (JOHANSEN, 1940) logo após a coleta. Para iniciar a preparação das lâminas permanentes, o material vegetal foi lavado em água e submetido ao processo de desidratação seguindo uma sequência crescente de álcool etílico (10 %, 20 %, 30 %, 40 % e 50 %), permanecendo duas horas em cada etapa. Esse material foi deixado no dessecador por 24 h, para eliminação do ar existente. Em seguida, o material foi deixado em solução de infiltração de historresina com álcool 96 % *overnight* e depois em solução pura de historresina.

O bloco foi montado a partir da fixação da historresina a um suporte de madeira e para montagem das lâminas foi seccionado utilizando-se um micrótomo (Leica RM-2145, Wetzlar, Alemanha). As lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN, FEDER; MC CULL, 1964).

As imagens dos cortes foram obtidas em microscópio de luz da marca Leica ICC50HD e software Leica LAS EZ versão 3.0 (Wetzlar, Alemanha).

3.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Visando obter informações preliminares das classes de metabólitos presentes na inflorescência de *M. x paradisiaca*, foi realizada uma prospecção fitoquímica. A investigação da presença dos grupos dos metabólitos secundários foi realizada segundo a metodologia de Matos (1997) e Simões et al. (2004). A presença foi verificada a partir da observação da reação característica esperada ou não, indicando resultado positivo ou negativo para cada grupo de constituinte analisado.

3.4.1 Pesquisa de alcaloides

Para realização deste ensaio foram colocadas cerca de 2 g da droga pulverizada em um tubo de ensaio e adicionadas 20 mL de solução de ácido sulfúrico a 1 %. Ferveu-se por 2 minutos e, na sequência, filtrou-se em algodão. Adicionou-se solução de hidróxido de amônio até obtenção de pH básico, juntando-se 7 mL de clorofórmio. A camada clorofórmica foi transferida para uma cápsula de porcelana e levada ao banho-maria até secura. O resíduo foi dissolvido com 5 mL de ácido sulfúrico a 1 % e a mistura distribuída em 7 tubos, realizando-se a pesquisa de alcaloides com os seguintes reativos: reagente de Dragendorff (reação positiva = precipitado alaranjado); reagente de Mayer (reação positiva = precipitado branco); reagente de Bertrand (reação positiva = precipitado branco); reagente de Bouchardat /Wagner (reação positiva = precipitado marrom); reagente ácido fosfomolibdico (reação positiva = precipitado branco); reagente ácido tânico (reação positiva = precipitado bege); reagente ácido pícrico (reação positiva = precipitado amarelo).

3.4.2 Pesquisa de flavonoides

A extração foi realizada fervendo-se em banho-maria por 2 minutos 1 g do material vegetal e 10 mL de etanol 70 %. Na sequência, filtrou-se em algodão e procedeu-se com as seguintes reações:

- Reação de Shinoda: colocou-se 2 mL do extrato alcoólico em um tubo de ensaio e adicionou-se em torno de 6 fragmentos de zinco metálico e 1 mL de ácido clorídrico. A reação é positiva se a coloração do extrato se tornar rósea a vermelha.
- Reação do cloreto férrico: adicionou-se algumas gotas de cloreto férrico 2 % em 1 mL do extrato. A coloração verde, amarela ou ainda violácea, dependendo do flavonoide presente, representa caracteristicamente sua presença.
- Reação com cloreto de alumínio: diferentes áreas de uma tira de papel de filtro foram umedecidas com o extrato. Sobre uma das regiões, colocou-se uma gota de solução de cloreto de alumínio a 5 % e comparou-se a fluorescência sob luz ultravioleta (ondas longas). A reação é positiva quando ocorre a intensificação de fluorescência com mudança de cor para verde amarelado.

3.4.3 Pesquisa de antraquinonas

- Antraquinonas livres – reação de Bornträger direta: colocou-se 0,2 g da droga pulverizada e adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio diluído. A reação é positiva quando se observa uma coloração rósea ou avermelhada.
- Glicosídeos antraquinônicos ou dímeros – reação de Bornträger com prévia hidrólise ácida: colocou-se 1 g de droga no tubo de ensaio, adicionou-se 8 mL de solução de etanol a 25 % e ferveu-se em chama por 1 minuto. Após, filtrou-se para um tubo de ensaio contendo 4 mL

de solução de ácido sulfúrico e aqueceu-se. Resfriou-se na torneira e adicionou-se 5 mL de clorofórmio, extraiu-se cuidadosamente por 3 minutos. Decantou-se a camada orgânica para um tubo de ensaio e adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio diluído. Após agitar fortemente, deixou-se em repouso. A reação é positiva se observada coloração rósea ou avermelhada na fase aquosa.

3.4.4 Pesquisa de taninos

Foi preparado um decocto com 5 g de droga vegetal pulverizada e 100 mL de água (15 minutos). Essa solução foi filtrada, deixada esfriar e distribuída em 4 tubos de ensaios (1 tubo = branco, contendo apenas o extrato) para realização dos testes de identificação. Duas técnicas com reação positiva confirmam a presença de taninos.

- Gelatina: foi adicionado a 2 mL do extrato 2 gotas de ácido clorídrico diluído e solução de gelatina a 2,5 % gota a gota. A reação é positiva se ocorrer formação de precipitado.
- Cloreto férrico: foi adicionado a 2 mL do extrato 10 mL de água e 2-4 gotas da solução de cloreto férrico a 1 % em metanol. A formação de cor azul é positiva para taninos hidrolisáveis ou gálico e a cor verde é positiva para taninos condensados ou catéquico.
- Acetato de chumbo: adicionou-se a 5 mL de extrato 10 mL de solução de ácido acético 10 % e 5 mL de solução de acetato de chumbo a 10 %. A reação é positiva para taninos hidrolisáveis se houver a formação de um precipitado esbranquiçado.

Também foi realizada a reação de Stiasny para separação dos taninos condensados e hidrolisáveis, submetendo-se em refluxo por 30 minutos 50 mL do extrato com 15 mL de reativo de Stiasny. Os taninos condensados originam um precipitado vermelho (flobafenos). Os taninos hidrolisáveis permanecem em solução e podem ser identificados da seguinte forma: adicionou-se a 10 mL do filtrado 1 g de acetato de sódio e 2-4 gotas de cloreto férrico a 1 % em metanol. A reação é positiva se houver a formação da cor azul.

3.4.5 Pesquisa de saponinas

Ferveu-se 2 g de droga com 10 mL de água destilada por 3 minutos. Agitou-se energeticamente, no sentido vertical, por 15 segundos. A solução foi deixada em repouso por 15 minutos e marcou-se com uma caneta a altura da espuma formada. A persistência da espuma durante os 15 minutos confirma a presença de saponinas.

3.5 AVALIAÇÃO DE SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FLORES E BRÁCTEAS

Considerando que os compostos fenólicos possam ser os responsáveis pelas atividades biológicas relatadas na literatura para as espécies do gênero *Musa*, o uso de diferentes solventes e suas misturas foram avaliados em relação a extração de compostos fenólicos das flores e brácteas de *M. x paradisiaca*. A avaliação foi realizada seguindo um planejamento experimental do tipo centroide simplex com três componentes: metanol, etanol e água. Foram obtidas 10 diferentes misturas, todas realizadas em duplicata, obtendo-se um total de 20 experimentos para cada parte da planta. A composição das misturas em termos de proporção é apresentada no Quadro 2.

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DAS MISTURAS EXTRATORAS EM TERMOS DE PROPORÇÃO DE SOLVENTES

Mistura	Extratos ^a	Solvente (parte)		
		Água	Metanol	Etanol
1	A	1	-	-
2	M	-	1	-
3	E	-	-	1
4	AM	1/2	1/2	-
5	AE	1/2	-	1/2
6	ME	-	1/2	1/2
7	AME	2/3	1/6	1/6
8	MAE	1/6	2/3	1/6
9	EAM	1/6	1/6	2/3
10	PC	1/3	1/3	1/3

FONTE: O autor (2018).

Nota: ^a preparados para flor e bráctea, em duplicata. A, água; M, metanol; E, etanol; AM, água e metanol; AE, água e etanol; ME, metanol e água; AME, água, metanol e etanol; MAE, metanol, água e etanol; EAM, etanol, água e metanol; PC, ponto central.

Flores e brácteas secas e trituradas foram pesadas em balança analítica (Mettler-Toledo, Columbus, EUA) e foram transferidas para frascos de vidro, adicionando-se os solventes e suas misturas (conforme descrito no Quadro 2) na proporção 1:10 (material vegetal seco:solvente, *p/v*). Os frascos foram levados ao banho de ultrassom (Branson, modelo 5510, Danbury, EUA) a uma frequência de 40 kHz por 30 minutos (condições determinadas a partir de estudos prévios – dados não apresentados). Ao término do tempo, os extratos foram filtrados e analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A partir dos resultados obtidos para cada ensaio, foram calculados os efeitos e coeficientes para variáveis estudadas com o auxílio do programa Statistica 10.0, utilizando um intervalo de confiança de 95 %.

3.5.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinação quantitativa de compostos fenólicos totais utilizou-se o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) com modificações. Nesse método, os compostos fenólicos em meio básico formam o ânion fenolato, o qual reduz o molibdato (reagente de Folin-Ciocalteu) em óxido de

molibdênio, provavelmente por um mecanismo de transferência de elétrons, formando um complexo de molibdênio-tungstênio de coloração azul intensa.

Foram utilizados 160 µL dos extratos obtidos, adicionados de 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1540 µL de água em tubo de Falcon. Em seguida adicionou-se 200 µL de carbonato de sódio 10 % às amostras e estas foram agitadas em vórtex por 30 segundos. As amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente (25 °C) e, na sequência, determinou-se a absorbância de cada amostra a 760 nm em espectrofotômetro ultravioleta-vísível Agilent Technologies 8453 (Santa Clara, EUA). A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com uma solução padrão de ácido gálico nas seguintes concentrações: 2,5, 5, 10, 15 e 20 µg/mL. Os resultados foram expressos como g de compostos fenólicos totais equivalentes em ácido gálico (EAG) por 100 g de material vegetal seco (flor ou bráctea).

3.6 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A partir do resultado da avaliação de solventes na extração de compostos fenólicos das flores e brácteas (item 3.5), definiu-se o solvente para melhor extração de compostos fenólicos totais (etanol 50 % (v/v)). Além desse solvente, foram preparados extratos aquosos, por ser o solvente empregado no uso popular, e extratos em metanol e acetona com a finalidade de verificar diferenças na composição química.

3.6.1 Preparo dos extratos aquosos, metanólicos, hidroetanólicos e em acetona de flores e brácteas

Os extratos de flores e brácteas foram preparados a partir do material vegetal estabilizado (conforme descrito no item 3.6). A extração assistida por ultrassom tem

sido amplamente utilizada na extração de compostos naturais de diferentes materiais vegetais (BOONKIRD, PHISALAPHONG; PHISALAPHONG, 2008; LI et al., 2011; PANDEY et al., 2016; SHEORAN et al., 2015). Essa técnica não-convencional apresenta como vantagens menor tempo de preparo e melhora de rendimento, já que facilita o intumescimento e hidratação do material vegetal, melhorando o processo de difusão (VINATORU, 2001). Portanto, para a extração dos compostos das flores e brácteas de *M. x paradisiaca* foi escolhida a técnica de extração assistida por ultrassom adaptado de Pandey et al. (2016).

Flores e brácteas secas e trituradas foram pesadas em balança analítica (Mettler-Toledo, Columbus, EUA) e foram transferidas para frascos de vidro, adicionando-se como solvente extrator água ultrapura, etanol 50 % (v/v), metanol ou acetona na proporção 1:10 (material vegetal seco:solvente, p/v). Os frascos foram levados ao banho de ultrassom (Branson, modelo 5510, Danbury, EUA) a uma frequência de 40 kHz por 30 minutos. Ao término do tempo, o líquido foi filtrado em tecido e o resíduo foi submetido a nova extração sob as mesmas condições.

O volume total filtrado foi transferido para frascos de vidro previamente tarados. Os extratos obtidos com acetona e metanol foram secos e os hidroetanólicos concentrados sob pressão reduzida em concentrador de amostras Centrivap (Labconco, Kansas City, EUA) a 40 °C. Os extratos aquosos e os hidroetanólicos concentrados foram congelados em freezer -40 °C e liofilizados (liofilizador *Virtis Advantage Plus*, SP Scientific, Warminster, Inglaterra) a -80 °C, 100 mTorr, por 48 h.

Após os procedimentos de secagem, os frascos foram pesados e os rendimentos da extração calculados. Os frascos foram vedados com película flexível (Parafilm®), embalados em sacos plásticos e armazenados em freezer -80 °C até o momento das análises.

3.6.2 Procedimento de remoção de açúcares dos extratos aquosos de flores e brácteas

Visando remover os açúcares livres dos extratos aquosos, foi realizado um procedimento utilizando resina. O extrato aquoso da flor (EAF) e o extrato aquoso da

bráctea (EAB) foram submetidos a um processo de limpeza para remoção de açúcares em resina Amberlite XAD-2 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (MELO, 2011). Para esse fracionamento, 8 g de cada extrato bruto foram solubilizados em 100 mL de água, sendo o pH corrigido para 2,0 com HCl. O extrato em água foi misturado com 12 g de resina Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 20-60 mesh) em agitador magnético por 1 hora, e, em seguida, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm). A amberlite impregnada de extrato bruto foi lavada com 1 L de água. A fração adsorvida na coluna foi então eluída com 370 mL metanol, e seca sob pressão reduzida em concentrador de amostras Centrivap (Labconco, Kansas City, EUA) a 40 ° C. As frações metanólicas de flor (FMF) e bráctea (FMB) foram pesadas para os cálculos de rendimento e armazenadas em freezer -80 °C até o momento das análises.

3.7 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DOS EXTRATOS

3.7.1 Identificação dos constituintes dos extratos aquosos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos a espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM)

Os extratos aquosos (EAF e EAB) e suas frações (FMF e FMB) foram analisados em um cromatógrafo líquido ultrarrápido modelo Prominence UFLC (Shimadzu, Quioto, Japão) acoplado ao detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas MicrOTOF-Q III (Bruker Daltonics, Billerica, USA) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador quadrupolo-tempo de voo (QqTOF). As análises foram realizadas em coluna Kinetex C18 (2,6 µm, 2,1 mm x 150 mm) (Phenomenex). O volume de injeção foi de 1 µL com vazão de 0,3 mL/min e temperatura de 40 °C. A fase móvel utilizada foi água deionizada (solvente A) e acetonitrila (solvente B), ambos contendo ácido fórmico a 0,1 % (v/v). A eluição foi realizada em modo gradiente na seguinte programação: 0-2 min – 3 % B (isocrático), 2-25 min – 3-25 % B (gradiente linear), 25-40 min – 25-80 % B (gradiente linear).

As amostras foram analisadas em modo de ionização negativa e positiva. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização (4 Bar), de secagem (9 L/min, 200 °C) e de colisão. A voltagem do capilar foi de 3500 V.

Os extratos e frações foram solubilizados em acetonitrila e água (7:3, v/v) na concentração de 1 mg/mL, filtrados em filtros com membrana de PTFE de 0,22 µm x 3,0 mm (Millex™, Millipore). Os compostos foram identificados a partir da sua *m/z*, íons fragmentos e perfil espectral no ultravioleta na região de 190 a 400 nm, comparando-se com dados previamente publicados na literatura.

3.7.2 Comparação da composição química dos extratos aquosos, metanólicos, hidroetanólicos e em acetona das brácteas e flores por CLAE-DAD-EM

Para a comparação entre os extratos obtidos com diferentes solventes (água, etanol 50 % (v/v), metanol e acetona – item 3.6.1), estes foram preparados em uma concentração de 1 mg/mL e injetados sob as mesmas condições descritas no item 3.7.1. Entretanto, o método de eluição em gradiente empregado foi: 0-8 min – 3 % B, 8-30 min – 8-25 % B, 30-60 min – 25-80 % B e 60-63 min – 80 % B. Os compostos foram identificados a partir da sua *m/z*, íons fragmentos e perfil espectral no ultravioleta na região de 190 a 400 nm, comparando-se com dados da literatura.

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DOS EXTRATOS AQUOSOS E HIDROETANÓLICOS NA VIA CLÁSSICA E VIA ALTERNATIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO

De acordo com os resultados da avaliação dos solventes para melhor extração dos compostos fenólicos (item 3.5) e considerando o solvente utilizado nas preparações no uso popular, optou-se por estudar a atividade dos extratos das brácteas e flores preparados em etanol 50 % (v/v) e em água. A atividade dos extratos aquosos e hidroetanólicos na via clássica e via alternativa do sistema complemento

foi analisada utilizando o ensaio hemolítico com eritrócitos de carneiro e eritrócitos de coelho, respectivamente (ALBAN et al., 2002). Os resultados obtidos foram expressos em relação à percentagem de inibição de hemólise (ICH_{50} – concentração de amostra que provoca 50 % de inibição da lise de hemácias), como descrito por Alban e colaboradores (2002). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8.1 Preparo das suspensões de hemácias de carneiro

Para o preparo da suspensão de hemácias de carneiro (via clássica), 5 mL de hemácias de carneiro desfibrinado (NewProv, Curitiba, Brasil) foram centrifugados a $1440 \times g$ por 5 minutos. As hemácias foram lavadas por duas vezes com solução salina (0,9 %, *p/v*) e uma vez com tampão HEPES da via clássica (tampão HC) (10 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 0,11 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, pH 7,4). Na sequência, as hemácias separadas foram diluídas em tampão HC na proporção 1:5 (*v/v*). Para sensibilização das hemácias, adicionou-se mesmo volume de hemolisina (soro de coelho anti-hemácia de carneiro – Laborclin, Curitiba, Brasil) (1:100, *v/v*) e o material foi incubado a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, as hemácias sensibilizadas foram lavadas três vezes em tampão HC e diluídas no mesmo tampão (1:100, *v/v*).

3.8.2 Preparo das suspensões de hemácias de coelho

Para o preparo da suspensão de hemácias de coelho (via alternativa), 5 mL de hemácias de coelho (Laborclin, Curitiba, Brasil) foram centrifugados a $1440 \times g$ por 5 minutos. As hemácias foram lavadas por duas vezes com solução salina (0,9 %, *p/v*) e uma vez com tampão HEPES da via alternativa (tampão HA) (10 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 7 mM, EGTA 10 mM, pH 7,4). Na sequência, as hemácias separadas foram diluídas em tampão HA na proporção 1:5 (*v/v*). Após a última lavagem, as hemácias foram diluídas no mesmo tampão (1:50, *v/v*).

3.8.3 Obtenção do soro humano e titulação

Um *pool* de soro humano foi utilizado como fonte dos componentes do sistema complemento. Esse *pool* foi obtido de doadores voluntários sadios de ambos os sexos que aceitaram participar da pesquisa, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) conforme projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sob nº 1.703.531.

As coletas foram realizadas por meio de punção venosa com técnica estéril em veia periférica de membro superior no Laboratório Escola de Análises Clínicas, departamento de Análises Clínicas – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Uma alíquota de 10 mL de sangue foi coletada de cada voluntário em tubos sem anticoagulante. Após a coagulação em temperatura ambiente, o sangue foi centrifugado a 1440 *g*, à 15 °C, por 20 minutos para obtenção do soro. O *pool* de soro foi fracionado em tubos e armazenado em freezer -80 °C.

Para a determinação da concentração do soro a ser utilizada nos ensaios, foi realizada uma série de diluições do *pool* de soro em tampão (HC ou HA) (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64). Uma alíquota de 100 µL de cada concentração de soro foi adicionada de 100 µL de hemácias sensibilizadas com hemolisina ou hemácias de coelho e 40 µL de tampão em placa de 96 poços, fundo cônico. Foram preparados também dois controles: a) controle 100 % de hemólise – 100 µL de hemácias (sensibilizadas com hemolisina ou de coelho) adicionados de 140 µL de água; b) controle de hemólise espontânea – 100 µL de hemácias (sensibilizadas com hemolisina ou de coelho) adicionados de 140 µL de tampão. A placa foi incubada em estufa a 37 °C por 30 minutos. Na sequência, foi centrifugada a 1440 x *g*, a 2 °C, por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL de sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços, fundo chato, e a leitura foi realizada em 405 nm em espectrofotômetro para microplacas (Multiskan™ FC, Waltham, EUA). A porcentagem de inibição de hemólise foi calculada a partir do controle 100 % de hemólise, determinando-se a concentração de soro capaz de inibir 50 % de hemólise.

3.8.4 Ensaio hemolítico dos extratos

Com o objetivo de avaliar a atividade hemolítica dos extratos e definir a concentração de trabalho para o ensaio da via clássica e via alternativa, diferentes concentrações do extrato aquoso e hidroetanólico (10-1000 µg/mL) foram analisadas. Foram incubados nas mesmas condições do ensaio da via clássica e alternativa (estufa à 37 °C, por 30 minutos) 40 µL de extrato adicionados de 100 µL de hemácias (sensibilizadas com hemolisina ou de coelho) e 40 µL de tampão. Juntamente foram incubados os controles 100 % de hemólise e controle de hemólise espontânea (descritos no item 3.8.3) e os extratos diluídos em tampão nas diferentes concentrações como branco. Ao término da incubação, a placa foi centrifugada a 1440 x g, a 2 °C, por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL de sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços, fundo chato, e a leitura foi realizada em 405 nm em espectrofotômetro de placas. A porcentagem de hemólise foi calculada a partir do controle 100 % de hemólise e selecionada a maior concentração de extrato analisada que apresentou taxa de hemólise próxima a do controle de hemólise espontânea.

3.8.5 Preparo dos extratos e controle positivo de inibição para o ensaio da via clássica e via alternativa

As soluções de trabalho dos extratos e de heparina (controle positivo de inibição da ativação da via clássica e via alternativa) foram preparadas a partir da solubilização e diluição seriada em tampão dos EAF, EAB, EEF, EEB e heparina em pó (157,3 UI/mg). Os extratos foram diluídos de acordo com os resultados do ensaio hemolítico do extrato (item 3.8.4).

As concentrações de extrato e heparina avaliadas no ensaio da via clássica são apresentadas no Quadro 3 e 4.

QUADRO 3 – CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS AQUOSOS DE FLOR (EAF) E BRÁCTEA (EAB) E HEPARINA AVALIADAS NO ENSAIO DA VIA CLÁSSICA

SOLUÇÕES	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)						
	1	2	3	4	5	6	7
EAF	1000	562	316	178	100	56	-
EAB	500	281	158	89	50	28	-
HEPARINA	1000	316	100	32	10	3	1

FONTE: O autor (2018).

QUADRO 4 – CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE FLOR (EEF) E BRÁCTEA (EEB) E HEPARINA AVALIADAS NO ENSAIO DA VIA ALTERNATIVA

SOLUÇÕES	CONCENTRAÇÃO (µg/mL)					
	1	2	3	4	5	6
EAF	1000	562	316	178	100	56
EAB	1000	562	316	178	100	56
HEPARINA	1000	316	100	32	10	-

FONTE: O autor (2018).

3.8.6 Ensaio da via clássica

O ensaio da via clássica foi realizado incubando-se as diferentes concentrações dos extratos (EAF, EAB, EEF e EEB) com as hemácias de carneiro sensibilizadas e o soro humano (fonte dos componentes do sistema complemento), verificando a interferência do extrato na ativação da via clássica através da taxa de hemólise. Para que seja identificado o tipo de interferência do extrato (pró-inflamatório ou anti-inflamatório), o ensaio é conduzido em duas etapas: uma etapa com incubação prévia da solução de extrato com o soro humano; e uma etapa sem incubação prévia da solução de extrato com o soro humano.

Na etapa com incubação prévia, 40 µL de solução de extrato juntamente com 100 µL de soro humano (diluição em tampão HC 1:3, v/v) foram colocados em placa de 96 poços, fundo cônico, e incubados em estufa à 37 °C por 30 minutos. Após a incubação prévia, foram adicionados 100 µL de hemácias de carneiro sensibilizadas (diluição em tampão HC 1:100, v/v) e incubados em estufa à 37 °C por 30 minutos. Ao término da incubação, a placa foi centrifugada a 1440 x g, a 2 °C, por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL de sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços, fundo chato, e a leitura foi realizada em 405 nm em espectrofotômetro de placas.

Na segunda etapa, o ensaio foi conduzido sem incubação prévia, ou seja, 40 µL de solução de extrato, 100 µL de soro humano (diluição em tampão HC 1:3, v/v)

e 100 µL de hemácias de carneiro sensibilizadas (diluição em tampão HC 1:100, v/v) foram incubados em estufa à 37 °C por 30 minutos. Ao término da incubação, procedeu-se da mesma forma, centrifugando a placa, transferindo o sobrenadante para outra placa e realizando a leitura em 405 nm.

Em ambas as etapas foram incluídos os seguintes controles e branco:

- a) Controle de lise espontânea da hemácia: 140 µL de tampão HC + 100 µL de hemácias sensibilizadas – usado para monitorar a qualidade das hemácias e para o cálculo de inibição de hemólise;
- b) Controle 100 % da ativação da via clássica: 40 µL de tampão HC + 100 µL de soro humano + 100 µL de hemácias sensibilizadas – usado como 100 % para o cálculo de inibição de hemólise;
- c) Controle 100 % de hemólise: 140 µL de água + 100 µL de hemácias sensibilizadas – usado para o cálculo de porcentagem de hemólise dos controles;
- d) Controle de inibição da ativação da via clássica: 40 µL de tampão HC + 100 µL de soro humano + 100 µL de hemácias sensibilizadas – usado como controle positivo de inibição do complemento;
- e) Branco: 40 µL da solução do extrato + 100 µL de tampão HC + 100 µL de hemácias sensibilizadas – preparado para cada concentração de extrato avaliada, usado para descontar a absorbância e hemólise decorrente do próprio extrato.

A porcentagem de inibição da hemólise para as diferentes concentrações dos extratos foi calculada segundo a equação (3):

$$\% \text{ inibição de hemólise} = 100 - \frac{(\text{abs da amostra} - \text{abs do branco})}{(\text{abs do C100 \%} - \text{abs da LE})} \quad (3)$$

No qual:

abs da amostra: absorbância da amostra

abs do branco: absorbância do branco

abs do C100 %: absorbância do controle 100 % da ativação da via clássica ou alternativa

abs da LE: absorbância do controle de lise espontânea da hemácia

3.8.7 Ensaio da via alternativa

O ensaio da via alternativa foi realizado incubando-se as diferentes concentrações dos extratos (EAF, EAB, EEF e EEB) com as hemácias de coelho e o soro humano (fonte dos componentes do sistema complemento), verificando a interferência do extrato na ativação da via alternativa através da taxa de hemólise. Para que seja identificado o tipo de interferência do extrato (pró-inflamatório ou anti-inflamatório), o ensaio é conduzido em duas etapas: uma etapa com incubação prévia da solução de extrato com o soro humano; e uma etapa sem incubação prévia da solução de extrato com o soro humano.

Na etapa com incubação prévia, 40 µL de solução de extrato juntamente com 100 µL de soro humano (diluição em tampão HA 1:3, v/v) foram colocados em placa de 96 poços, fundo v, e incubados em estufa à 37 °C por 30 minutos. Após a incubação prévia, foram adicionados 100 µL de hemácias de coelho (diluição em tampão HA 1:50, v/v) e incubados em estufa à 37 °C por 30 minutos. Ao término da incubação, a placa foi centrifugada a 1440 x g, a 2 °C, por 5 minutos. Uma alíquota de 200 µL de sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços, fundo chato, e a leitura foi realizada em 405 nm em espectrofotômetro de placas.

Na segunda etapa, o ensaio foi conduzido sem incubação prévia, ou seja, 40 µL de solução de extrato, 100 µL de soro humano (diluição em tampão HA 1:3, v/v) e 100 µL de hemácias de coelho (diluição em tampão HA 1:50, v/v) foram incubados em estufa à 37 °C por 30 minutos. Ao término da incubação, procedeu-se da mesma forma, centrifugando a placa, transferindo o sobrenadante para outra placa e realizando a leitura em 405 nm.

Em ambas as etapas foram incluídos os seguintes controles e branco:

- a) Controle de lise espontânea da hemácia: 140 µL de tampão HA + 100 µL de hemácias de coelho – usado para monitorar a qualidade das hemácias e para o cálculo de inibição de hemólise;
- b) Controle 100 % da ativação da via alternativa: 40 µL de tampão HA + 100 µL de soro humano + 100 µL de hemácias de coelho – usado como 100 % para o cálculo de inibição de hemólise;

- c) Controle 100 % de hemólise: 140 μ L de água + 100 μ L de hemácias sensibilizadas – usado para o cálculo de porcentagem de hemólise dos controles;
- d) Controle de inibição da ativação da via clássica: 40 μ L de tampão HA + 100 μ L de soro humano + 100 μ L de hemácias sensibilizadas – usado como controle positivo de inibição do complemento;
- e) Branco: 40 μ L da solução do extrato + 100 μ L de tampão HA + 100 μ L de hemácias sensibilizadas – preparado para cada concentração de extrato avaliada, usado para descontar a absorbância e hemólise decorrente do próprio extrato.

A porcentagem de inibição da hemólise para as diferentes concentrações dos extratos foi calculada segundo a equação (3).

3.8.8 Análises estatísticas

A partir dos resultados de porcentagem de inibição de hemólise para os ensaios da via clássica e via alternativa, construiu-se para cada etapa de ensaio dos extratos e solução de heparina (com e sem incubação prévia) uma curva de porcentagem de inibição de hemólise *versus* concentração, determinando-se os valores de ICH_{50} por regressão logística (FINDLAY; DILLARD, 2007), expressos como média e erro padrão (Software OriginPro®, OriginLab, Wellesley Hills, EUA). As porcentagens de inibição de hemólise das diferentes concentrações de extratos foram comparadas com o controle (heparina) por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

3.9 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS AQUOSOS E SUAS FRAÇÕES NA TOLERÂNCIA A GLICOSE ORAL E NÍVEIS GLICÊMICOS DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

Levando em consideração que as preparações do uso popular utilizam água como solvente extrator, foram selecionados para o estudo da atividade antidiabética *in vivo* da inflorescência os extratos aquosos e suas frações. Além disso, visto a não identificação de estudos dessa atividade para as brácteas, estas foram incluídas na avaliação assim como as flores. Para avaliação dos efeitos antidiabéticos dos extratos aquosos e frações de *M. x paradisiaca* foi escolhido o modelo experimental de DM induzido pela administração de STZ em ratos. Este modelo tem sido amplamente utilizado, uma vez que mimetiza as complicações metabólicas observadas no indivíduo diabético (SINGH; PATHAK, 2015). Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 31/2017 (Anexo 2).

3.9.1 Preparo dos tratamentos administrados nos animais

3.9.1.1 Preparo das soluções dos extratos e frações

As soluções de EAB, FMB, EAF e FMF para administração via orogástrica (gavagem) foram preparadas diariamente, antes de cada uma das administrações. Porções de extratos brutos e frações de massa conhecida foram descongelados e solubilizados em quantidade de água suficiente para obtenção de 50 % da dose diária (100 mg/kg) em um volume de 0,5 mL.

3.9.1.2 Preparo da suspensão de ácido *p*-cumárico

Devido à baixa solubilidade do ácido *p*-cumárico (≥ 98 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em água, foi preparada uma suspensão de carboximetilcelulose 1 % (*p/v*) para permitir a administração via orogástrica (gavagem) desse composto (KIANG, REID; JONA, 2012). A suspensão de ácido *p*-cumárico foi preparada diariamente antes de cada administração, obtendo-se 50 % da dose diária (10 mg/kg) em um volume de 0,5 mL.

3.9.1.3 Preparo da insulina

A insulina (Humulin® NPH 100 UI/mL, Lilly, Indianápolis, EUA) foi diluída em solução salina 0,85 % (*p/v*) diariamente antes de cada administração subcutânea obtendo-se 50 % da dose diária (2 U/kg) em um volume de 0,3 mL (GUTIERRES et al., 2015).

3.9.2 Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo de tamanho da amostra adotou-se a publicação de Chow & Liu (2000) (equação (4)). Tal procedimento considera o nível de significância, o poder do teste e coeficiente de variação (CV) do parâmetro a ser estudado. O tamanho amostral mínimo foi calculado com nível de significância de 0,05 e poder de 80 % para detectar uma diferença superior a 20 % entre os grupos de animais utilizados.

$$n \geq \left[t(a; 2n - 2) + t\left(\frac{1-b}{2}; 2n - 2\right) \right]^2 \times \left(\frac{CV}{20}\right)^2 \quad (4)$$

No qual:

n = número de animais

a = nível de significância

b = poder do teste

CV = coeficiente de variação

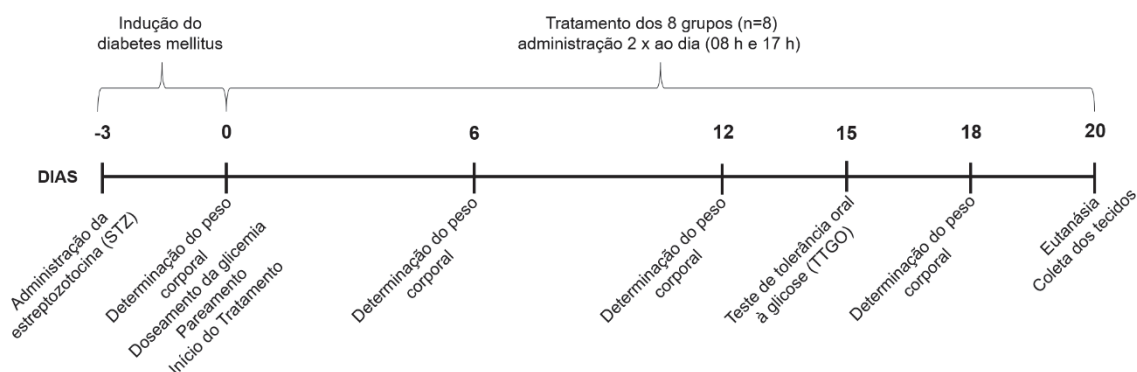
O n considerado para início dos cálculos foi de 6 e um CV igual a 13 %, baseando-se nas publicações com estudos utilizando modelos de indução do DM com agentes diabetogênicos (BORA; DAS, 2007; DHANABAL, et al., 2005; JAWLA; KUMAR; KHAN, 2012). O valor resultou em $n \geq 7$ animais por grupo, definindo-se um $n = 8$ por grupo. Portanto, foram utilizados um total de 64 animais, uma vez que 8 grupos foram realizados.

3.9.3 Delineamento experimental

Ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem *Wistar* (150 g), provenientes do Biotério Central de Botucatu, UNESP, foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Toxicologia, FCFAr/UNESP, recebendo dieta comercial e água *ad libitum* e mantidos em ciclo luz-escuro de 12 horas e temperatura de 25 °C. Os animais permaneceram nestas condições por 48 horas antes do início dos experimentos.

Um esquema sintetizando o delineamento experimental é apresentado abaixo (Figura 8).

FIGURA 8 – SÍNTESE DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



FONTE: O autor (2018).

3.9.3.1 Indução do diabetes mellitus experimental

Para a indução do DM foi utilizada STZ, dissolvida em tampão citrato 0,01M (pH 4,5) e administrada aos ratos após jejum de 12 horas, na dose de 40 mg STZ/kg de peso corporal, via veia jugular nos animais anestesiados com isoflurano e analgésicos com flunixinina meglumina (Banamine®).

De forma a confirmar o sucesso da indução com STZ, após 72 h foram determinados os níveis glicêmicos dos animais utilizando-se kit comercial (Biotécnica, Varginha, Brasil). Para dosagem da glicemia pós-prandial, os animais foram mantidos em caixas aquecidas para que ocorresse vasodilatação periférica e foi seccionado aproximadamente 3 mm da extremidade da cauda, por onde foi coletado o sangue do animal. Considerando que a instalação de um quadro de diabetes severa nesse modelo corresponde a uma glicemia entre 300-600 mg/dL, foram utilizados os animais com glicemia pós-prandial igual ou superior a 350 mg/dL (FURMAN, 2015).

3.9.3.2 Experimento

Após a dosagem dos níveis glicêmicos e pesagem dos animais, estes foram divididos nos diferentes grupos pareados de acordo com os valores médios de

glicemia e peso corporal. Os animais foram divididos em oito grupos (n = 8), conforme os tratamentos realizados (Quadro 5).

QUADRO 5 – DESCRIÇÃO DOS GRUPOS E RESPECTIVOS TRATAMENTOS

Grupo		Tratamento
1	N	Normal tratado com veículo (água)
2	D	Diabético tratado com veículo (água)
3	DINS	Diabético tratado com 4 U de insulina
4	DEAB	Diabético tratado com 200 mg/kg de extrato bruto da bráctea (EAB)
5	DFMB	Diabético tratado com 200 mg/kg de fração metanólica da bráctea (FMB)
6	DEAF	Diabético tratado com 200 mg/kg de extrato bruto da flor (EAF)
7	DFMF	Diabético tratado com 200 mg/kg de fração metanólica da flor (FMF)
8	Dp-AC	Diabético tratado com 20 mg/kg ácido p-cumárico

FONTE: O autor (2018).

Os animais de todos os grupos foram tratados durante 20 dias, duas vezes ao dia (às 08 e às 17 horas). Os grupos 4, 5, 6 e 7 receberam os extratos e frações e o grupo 8 o ácido *p*-cumárico por via orogástrica (gavagem), em volume de 0,5 mL de solução/animal/administração (NEERVANNAN, 2006) e cada administração contendo 50 % da dose diária dos tratamentos. O tratamento via gavagem foi feito via acesso da cavidade oral ou do aparelho digestório por meio de um tubo esofágico ou estomacal. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam somente veículo (água) duas vezes ao dia.

Os animais do grupo 3 foram tratados com insulina (2 U, duas vezes ao dia, totalizando 4 U) por via subcutânea. A administração subcutânea foi realizada com agulha hipodérmica curta (normalmente 25x5 mm ou mais fina), passando apenas pela derme, o mais próximo da superfície, formando uma pápula após a administração da substância.

3.9.3.2.1 Teste de tolerância à glicose oral (TTGO)

No 15º dia de tratamento, os animais foram submetidos ao TTGO (GUTIERRES et al., 2015). Para essa análise, os animais foram colocados em jejum

às 21 horas do 14º dia. No 15º dia, os animais receberam os respectivos tratamentos às 07 horas e foram pesados para o cálculo do volume da solução de glicose. Duas horas após o tratamento (12 horas de jejum), foi administrada a solução de glicose (2 g/kg/rato) e monitorado os níveis de glicose no sangue (uso de kit comercial – Biotécnica, Varginha, Brasil), coletando-se sangue da cauda do animal nos seguintes tempos: 0 (antes da administração da solução de glicose), 15, 30, 60, 90, 120 minutos.

Os resultados foram expressos em mg/dL e plotados em um gráfico para cada grupo, calculando-se a área sob a curva (mg/dL/120 min) (ASC) (equação (5)). As diferenças entre grupos foram analisadas com *one-way* ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls* ($p < 0,05$) (Software GraphPad Prisma® 6.0, GraphPad, La Jolla, EUA).

$$ASC_{0-120 \text{ min}} = \frac{(G_{t0} + G_{t15}) \times (t_{15} - t_0)}{2} + \frac{(G_{t15} + G_{t30}) \times (t_{30} - t_{15})}{2} + \frac{(G_{t30} + G_{t60}) \times (t_{60} - t_{30})}{2} + \frac{(G_{t60} + G_{t90}) \times (t_{90} - t_{60})}{2} + \frac{(G_{t90} + G_{t120}) \times (t_{120} - t_{90})}{2} \quad (5)$$

Sendo:

G = glicemia

t = tempo

3.9.3.2.2 Eutanásia

Ao final do tratamento (20º dia), foi realizada a eutanásia pelo método de decapitação em guilhotina para a retirada do sangue para determinação de níveis glicêmicos (kit comercial – Biotécnica, Varginha, Brasil) e análises bioquímicas posteriores.

3.9.3.2.3 Coleta de órgãos e análise histológica

Após a eutanásia, foram coletados rim (rim direito) e fígado (menor lobo) dos animais para preparo de lâminas e análise histológica desses tecidos. Os órgãos

foram fixados em formalina tamponada de Carson (CAPUTO, GITIRANA; MANSO, 2010).

Para o preparo dos blocos, o material foi desidratado em uma sequência crescente de álcool, embebidos em xilol e parafina. Após a solidificação dos blocos, os cortes foram realizados em micrótomo, desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina-eosina (HE).

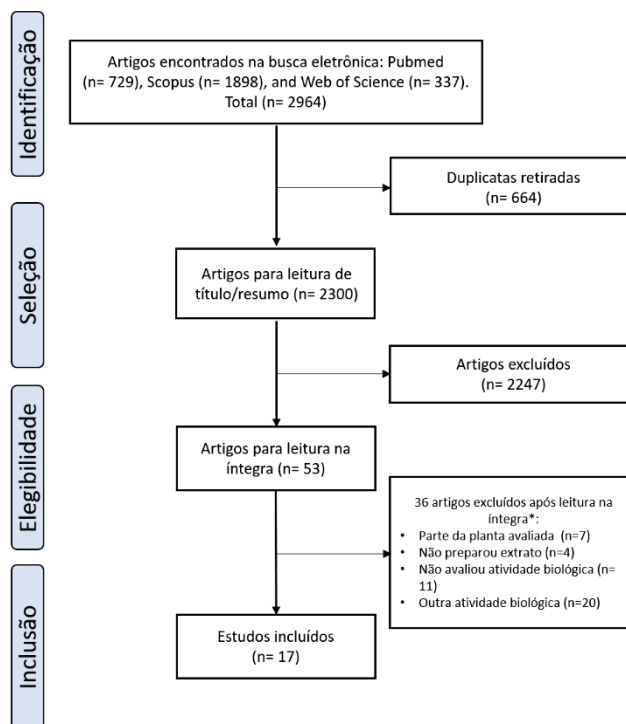
No tecido hepático foram analisadas alterações como tamanho dos núcleos, integridade e arquitetura lobular e cordões de hepatócitos. Para o tecido renal foram analisadas alterações nas regiões cortical e medular, como congestão celular, integridade dos glomérulos e da cápsula de Bowman, tamanho celular e tamanho dos núcleos e presença de células mononucleares. As alterações foram observadas em microscópio de luz Leica ICC50HD e software Leica LAS EZ versão 3.0 (Wetzlar, Alemanha), analisando-se 4 cortes de regiões diferentes por órgão por animal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

Durante a revisão de literatura verificou-se muitos artigos que avaliavam a atividade antidiabética das flores de *Musa* spp. Sendo assim, buscando-se avaliar o potencial antidiabético da inflorescência a partir dos estudos já publicados na literatura, foi realizada uma revisão sistemática. Como resultado, um total de 2300 estudos foram encontrados pela busca eletrônica após a remoção de duplicatas. Na avaliação dos títulos e resumos, 2247 artigos não atenderam aos critérios de inclusão e foram excluídos, restando 53 estudos para leitura na íntegra. Considerando os critérios de exclusão, 36 estudos foram excluídos (Apêndice 2) e 17 artigos foram considerados adequados para extração e análise de dados. A Figura 9 ilustra o processo de seleção sistemática dos estudos.

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE SELEÇÃO DE ARTIGOS (FLOWCHART PRISMA)

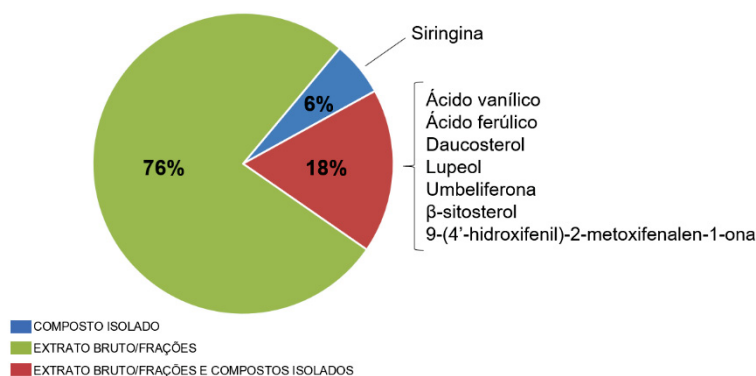


FONTE: Adaptado de LIBERATI et al. (2009).

NOTA: * A soma de artigos excluídos é maior que 36 porque alguns deles preencheram mais de um critério de exclusão (ver Apêndice 2).

Os estudos incluídos (ABDURRAZAK et al., 2015; AGUILARA et al., 1998; ARUN et al., 2017; BHASKAR, SALIMATH; NANDINI, 2011; BORAH; DAS, 2017; DHANABAL et al., 2005; DINESHKUMAR, ANALAVA; MANJUNATHA, 2010; DINESHKUMAR, MITRA; MANJUNATHA, 2010; JAWLA, KUMAR; KHAN, 2012; MARIKKAR et al., 2016; NISHA; MINI, 2013a; 2014; RAMU et al., 2016; RAMU et al., 2014; SHENG et al., 2014; SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, PILLAI SUBRAMANIAN; PILLAI SUBRAMANIAN, 2014a; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2012a) foram publicados entre 1998 e 2017 e 75 % eram da Índia. Todos os estudos investigaram a flor. Não foram encontrados estudos avaliando a atividade antidiabética da bráctea. A maioria dos estudos utilizou modelos antidiabéticos *in vivo* (53 %). Quanto à preparação do extrato, as técnicas mais aplicadas foram maceração (41 %) e Soxhlet (41 %); o etanol foi o solvente mais utilizado (65 %). Entre os 17 estudos elegíveis, é importante destacar que apenas quatro estudos avaliaram a atividade de um composto isolado da inflorescência (24 %) (Figura 10). Outras características desses estudos estão resumidas no Quadro 6.

FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS DE ACORDO COM O TIPO DE AMOSTRA ANALISADA



FONTE: O autor (2018).

QUADRO 6 – RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLuíDOS

(continua)

Autor (ano)	Espécie	País	Parte da planta	Processo de extração	Solvente	Concentração do extrato/composto	Atividade biológica
<i>in vitro</i>							
Abdurrazak (2015)	<i>M. paradisiaca</i>	Malásia	Tépalas secas	Maceração	MeOH/ EtOH/ W	15,6–1000 µg/ml	Inibição de α-glicosidase
Arun (2017)	<i>M. paradisiaca</i>	Índia	Inflorescência seca	Sequencial	AcOEt/ MeOH	50–250 µg/ml	Inibição de α-glicosidase e α-amilase Antiglicação Recaptação de glicose
Bhaskar (2011)	<i>Musa</i> sp.	Índia	Flores secas	Sequencial	Ace/ MeOH/ EtOH/W	Doses de 2–1000 µg	Recaptação de glicose
Dineshkumar (2010)	<i>M. sapientum</i>	Índia	Flores secas	Maceração	peth/hx/ Chl/EtOH/ W	10–100 µg/ml	Inibição de α-amilase
Marikkar (2016)	<i>M. cuminata</i> <i>M. balbisiana</i> <i>M. paradisiaca</i>	Malásia	Flores secas	Maceração	EtOH (80 % v/v)	200 µg/ml	Inibição de α-glicosidase e α-amilase
Nisha (2014)	<i>M. paradisiaca</i>	Índia	Flores secas	Soxhlet e fracionamento	MeOH ^a peth/AcOEt/ BuOH/W	-	Antiglicação
Ramu (2014)	<i>Musa</i> sp.	Índia	Flores secas	Soxhlet	EtOH	-	Inibição de α-glicosidase e aldose reductase Antiglicação
Sheng (2014)	<i>Musa</i> spp.	China	Flores secas	Maceração e fracionamento	EtOH (95 % v/v) ^b peth/AcOEt/ BuOH	-	Inibição de α-glicosidase

QUADRO 6 – RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLuíDOS

(conclusão)

Autor (ano)	Espécie	País	Parte da planta	Processo de extração	Solvente	Concentração do extrato/composto	Atividade biológica
in vivo							
Aguilara (1998)	<i>M. sapientum</i>	México	Flores frescas	Decocção	W	4 mL/kg	Tolerância à glicose em coelhos diabéticos
Borah (2017)	<i>M. balbisiana</i>	India	Flores secas	Soxhlet	EtOH (95 % v/v)	250 mg/kg	Efeito antidiabético em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina
Dhanabal (2005)	<i>M. sapientum</i>	India	Flores secas	Maceração	EtOH	200 mg/kg	Efeito hipoglicêmico em ratos com diabetes induzido por aloxana
Jawla (2012)	<i>M. paradisiaca</i>	India	Flores frescas	Maceração	EtOH (50 % v/v)	100, 250 e 500 mg/kg	Efeito anti-hiperglicêmico em ratos com diabetes induzido por aloxana
Nisha (2013)	<i>M. paradisiaca</i>	India	Flores secas	Soxhlet	MeOH/ AcOEt	200 mg/kg	Efeito hipoglicêmico em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina
Ramu (2016)	<i>Musa</i> sp.	India	Flores secas	Soxhlet	EtOH	100 e 200 mg/kg	Efeito hipoglicêmico em ratos com diabetes induzido por aloxana
Sundaram (2012)	<i>M. paradisiaca</i>	India	Flores secas	Soxhlet	EtOH (95 % v/v)	200 mg/kg	Regulação do metabolismo de carboidratos em tecidos hepáticos de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina
Sundaram (2014)	<i>M. paradisiaca</i>	India	Flores secas	Soxhlet	EtOH (95 % v/v)	50 mg/kg (siringina)	Efeito antidiabético em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina
Dineshkumar (2010)	<i>M. sapientum</i>	India	Flores secas	Maceração	W	5 mL/dia	Efeito antidiabético em pacientes com diabetes tipo 2

FONTE: O autor (2017).

NOTA: ^afrações do extrato metanólico; ^bfrações do extrato etanólico; AcOEt, acetate de etila; BuOH, n-butanol; CHl, clorofórmio; EtOH, etanol; hx, hexano; MeOH, metanol; peth, éter de petróleo; W, água.

4.1.1 Efeitos antidiabéticos em modelos de diabetes induzido *in vivo*

Dos 17 estudos incluídos, 7 avaliaram os efeitos antidiabéticos de extratos de flores e compostos isolados em ratos com diabetes induzido por STZ ou aloxana (BORAH; DAS, 2017; DHANABAL et al., 2005; JAWLA, KUMAR; KHAN, 2012; NISHA; MINI, 2013a; RAMU et al., 2016; SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, PILLAI SUBRAMANIAN; PILLAI SUBRAMANIAN, 2014a; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2012a) e 1 estudo avaliou a tolerância à glicose em coelhos diabéticos (AGUILARA et al., 1998).

Uma redução nos níveis glicêmicos dos ratos tratados com extratos de flores preparados em etanol (BORAH; DAS, 2017; DHANABAL et al., 2005; RAMU et al., 2016; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2012a), etanol 50 % (v/v) (JAWLA, KUMAR; KHAN, 2012), metanol e acetato de etila (NISHA; MINI, 2013a) foi observada quando comparados ao grupo controle diabético. Jawla, Kumar e Khan (2012) e Ramu et al. (2016) consideraram esse efeito dose-dependente (100-500 mg/kg). Além disso, alguns estudos mostraram a redução dos níveis de hemoglobina glicada nos animais tratados com os extratos do gênero *Musa* (NISHA; MINI, 2013a; RAMU et al., 2016; SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, PILLAI SUBRAMANIAN; PILLAI SUBRAMANIAN, 2014a; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2012a).

Aguilara et al. (1998) e Jawla, Kumar e Khan (2012) mostraram em seus estudos que os extratos de flores de *M. paradisiaca* melhoraram a tolerância à glicose oral em ratos e coelhos diabéticos.

Um efeito hipoglicêmico e regenerador de células beta pancreáticas também foi observado em ratos tratados com compostos isolados de extrato etanólico de flores de *M. paradisiaca*, a siringina (SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, PILLAI SUBRAMANIAN; PILLAI SUBRAMANIAN, 2014a), e de *Musa* sp., lupeol e umbeliferona (RAMU et al., 2016). Estes resultados estão de acordo com outros estudos que avaliaram estes compostos isolados. Por exemplo, a siringina isolada de *Eleutherococcus senticosus* apresentou ação hipoglicêmica em ratos diabéticos induzidos por STZ. Além disso, muitos triterpenóides naturais e cumarinas parecem ter propriedades antidiabéticas promissoras e atividade na prevenção de complicações diabéticas (LI, YAO; LI, 2017; NAZARUK; BORZYM-KLUCZYK, 2015).

Adicionalmente, efeitos que contribuem para prevenção de complicações relacionadas ao DM foram atribuídas às espécies do gênero *Musa* avaliadas: redução no colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein* - LDL), aumento de lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein – HDL) sérica e perda de peso corporal (NISHA; MINI, 2013b; RAMU et al., 2016; SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, PILLAI SUBRAMANIAN; PILLAI SUBRAMANIAN, 2014b; SUNDARAM; SUBRAMANIAN, 2012b); prevenção de redução de enzimas antioxidantes (DHANABAL et al., 2005).

Os autores atribuem essa atividade antilipidêmica à presença de pectinas (que elevam a viscosidade do conteúdo gastrintestinal e, portanto, reduzem a absorção e digestão de carboidratos), saponinas (que reduzem a absorção de colesterol no lúmen intestinal e estimulam a excreção de ácidos biliares), taninos (que diminuem a absorção dietética de colesterol) e ácido gálico (que inibe a colesterol-esterase e aumenta a excreção fecal de ácidos biliares), conforme já relatado em outros estudos (BROWN, GREENBURGH; TOMLIN, 2007; COHN et al., 2010; DIKEMAN, MURPHY; FAHEY JR., 2006; HARWOOD et al., 1993; NGAMUKOTE et al., 2011).

4.1.2 Inibição da digestão de carboidratos

Os efeitos na redução e controle da glicemia observados nesses podem ser decorrentes de inibição da digestão de carboidratos. Um total de 6 estudos avaliaram *in vitro* a atividade inibidora de enzimas como a α -glicosidase e α -amilase dos extratos de flores do gênero *Musa*. (ABDURRAZAK et al., 2015; ARUN et al., 2017; DINESHKUMAR, MITRA; MANJUNATHA, 2010; MARIKKAR et al., 2016; RAMU et al., 2014; SHENG et al., 2014).

De maneira geral, para os extratos avaliados por esses estudos notou-se uma melhor atividade inibidora da enzima α -glicosidase do que da α -amilase. Segundo os resultados de Dineshkumar, Mitra e Manjunatha (2010), dentre as diferentes espécies vegetais avaliadas como inibidoras de α -amilase, os extratos de *M. sapientum* foram classificados como de baixa ou nenhuma atividade.

Considerando, então, os resultados de atividade inibidora de α -glicosidase, os estudos possuem em comum a indicação de extratos produzidos em etanol (MARIKKAR et al., 2016; RAMU et al., 2014; SHENG et al., 2014) e metanol (ABDURRAZAK et al., 2015; ARUN et al., 2017) como responsáveis pelos melhores valores IC_{50} . Os valores de IC_{50} determinados para os extratos metanólicos de *M. paradisiaca* foram $60,00 \pm 0,14$ $\mu\text{g/mL}$ (ABDURRAZAK et al., 2015) e $106,37 \pm 1,25$ $\mu\text{g/mL}$ (ARUN et al., 2017), enquanto que para os extratos etanólicos de *Musa* spp. foram $7,79 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$ (RAMU et al., 2014) e $343,09 \pm 4,35$ $\mu\text{g/mL}$ (SHENG et al., 2014). De modo complementar, foram constatados em testes *in vitro* atividade inibidora de oxidação de LDL e de enzima conversora angiotensina (ECA), apontando para um efeito protetor cardiovascular, e atividade antiglicante sobre produtos de glicação avançada (ARUN et al., 2017). A atividade antiglicante *in vitro* de extrato metanólico de *M. paradisiaca* também foi constatada no estudo de Nisha e Mini (2014), destacando-se o efeito obtido para a fração acetato de etila.

Em relação aos compostos isolados por Ramu et al. (2014) (umbeliferona e lupeol) e por Sheng et al. (2014) (ácido vanílico, ácido ferúlico, daucosterol, β -sitosterol, 9-(4'-hidroxifenil)-2-metoxifenalen-1-ona) a umbeliferona, daucosterol, β -sitosterol e 9-(4'-hidroxifenil)-2-metoxifenalen-1-ona apresentaram atividade superior a acarbose (controle), permitindo estabelecer uma associação entre a presença desses compostos com a atividade do extrato bruto/fração. Além disso, umbeliferona e lupeol apresentaram (*in vitro*) atividade inibidora de aldose redutase e atividade antiglicante, corroborando com os achados de ação dos extratos na prevenção de complicações relacionadas ao DM (BORAH; DAS, 2017; RAMU et al., 2016).

4.1.3 Melhora na captação de glicose

Os estudos de Arun et al. (2017) e Bhaskar et al. (2011) relacionam a presença de compostos fenólicos com melhora da captação de glicose por receptores transportadores de glicose em modelos *in vitro*. Nestes estudos, as menores concentrações dos extratos avaliados mostraram ter efeito dose-dependente. Dentre

os extratos avaliados, os que se destacaram foram o extrato aquoso de *Musa* sp. e o extrato metanólico de *M. paradisiaca*.

4.1.4 Efeito antidiabético em humanos

Entre os artigos selecionados, apenas um avaliou a atividade antidiabética de flores de *Musa* spp. em humanos (DINESHKUMAR, ANALAVA; MANJUNATHA, 2010). Este estudo avaliou o potencial antidiabético de um extrato aquoso de *Musa sapientum* em voluntários diagnosticados com diabetes tipo 2 (n = 40; seleção aleatória). O extrato foi preparado em água por maceração usando 500 g de planta seca e um litro de água purificada e, ao contrário dos estudos em animais, o extrato administrado não foi seco e ressuspenso em veículo para administração.

Os voluntários foram divididos em um grupo experimental (20 voluntários receberam os extratos, 5 mL/dia, durante dois meses) e um grupo controle (20 voluntários receberam apenas água). Parâmetros antropométricos, clínicos e bioquímicos (glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de alta densidade, LDL) foram avaliados nos grupos. Os resultados foram analisados estatisticamente, mas o método utilizado não foi especificado (significância estatística = $p < 0,05$).

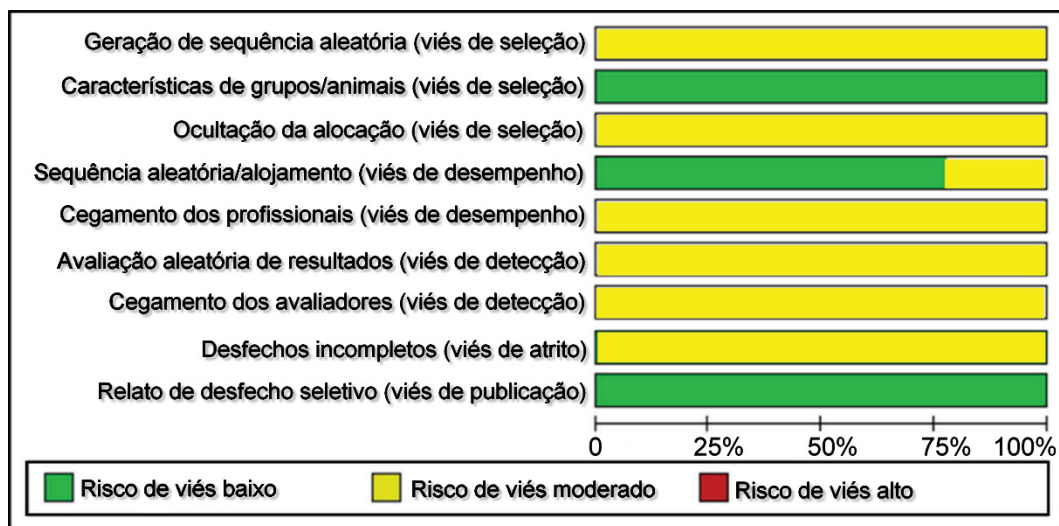
Segundo Dineshkumar, Analava e Manjunatha (2010), não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos entre o grupo experimental e o grupo controle. Esse resultado pode ser decorrente da dose administrada. Quando comparado com estudos em modelos animais, a dose administrada foi muito menor: 100 a 500 mg/kg/dia de extrato seco para animais *versus* apenas 5 mL/dia do extrato para voluntários (peso médio de 76 kg). Assim, mais estudos clínicos com doses mais adequadas devem ser realizados a fim de fortalecer essa evidência.

4.1.5 Avaliação da qualidade dos estudos

A geração da sequência e a ocultação da alocação não foram detalhadas em nenhum estudo experimental incluído, contribuindo para a ocorrência de alto risco de viés. Além disso, nenhum dos estudos executou o cegamento adequado entre os cuidadores de animais e os investigadores.

A avaliação da similaridade nas características basais entre os grupos experimental e controle foi considerada na distribuição dos grupos nos estudos incluídos, levando a um baixo risco de viés para este domínio. As condições de alojamento dos animais nos diferentes grupos de tratamento foram semelhantes em sete estudos (87,5 %), com apenas dois estudos (25 %) não relatando essas condições. Os resultados da avaliação da qualidade metodológica dos estudos de intervenção em animais incluídos nesta revisão sistemática são apresentados nas Figuras 11 e 12.

FIGURA 11 – GRÁFICO DO RISCO DE VIÉS PARA ESTUDOS DE INTERVENÇÃO EM ANIMAIS



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 12 – RESUMO DOS RESULTADOS DO CONSENSO DAS AVALIAÇÕES DE RISCO DE VIÉS PARA OS ESTUDOS EM ANIMAIS

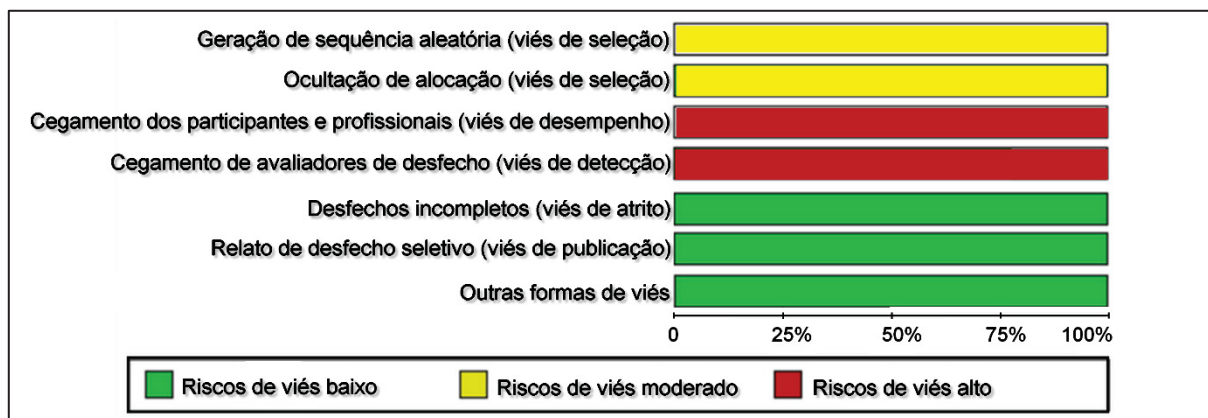
	Geração de sequência aleatória (viés de seleção)	Características de grupos/animais (viés de seleção)	Ocultação da alocação (viés de seleção)	Sequência aleatória/alocamento (viés de desempenho)	Cegamento dos profissionais (viés de desempenho)	Avaliação aleatória de resultados (viés de detecção)	Cegamento dos avaliadores (viés de detecção)	Desfechos incompletos (viés de atrito)	Relato de desfecho seletivo (viés de publicação)
Aguilara, 1998	?	+	?	?	?	?	?	?	+
Bhaskar, 2011	?	+	?	+	?	?	?	?	+
Borah, 2017	?	+	?	+	?	?	?	?	+
Dhanabal, 2005	?	+	?	?	?	?	?	?	+
Jawla, 2005	?	+	?	+	?	?	?	?	+
Ramu, 2016	?	+	?	+	?	?	?	?	+
Sundaram, 2012	?	+	?	+	?	?	?	?	+
Sundaram, 2014	?	+	?	+	?	?	?	?	+

FONTE: O autor (2018).

NOTA: Para cada domínio desta ferramenta (linha) os estudos (colunas) obtiveram uma resposta positiva quando cumpriam o quesito do domínio (círculos em verde), negativa quando não cumpriam os quesitos (círculos em vermelho) ou não foram encontradas referências ou as mesmas não foram completamente claras no estudo para um determinado domínio (círculos em amarelo).

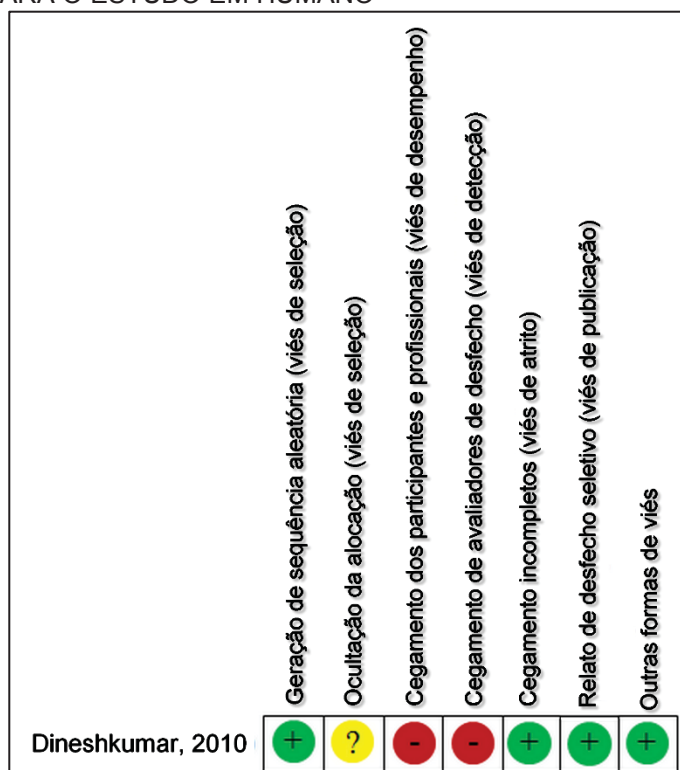
Em relação ao estudo em humanos, a geração de sequência aleatória, dados de resultados incompletos, relatórios seletivos e outros vieses foram considerados de baixo risco de viés (DINESHKUMAR, ANALAVA; MANJUNATHA, 2010). Os autores não foram claros ao relatar a ocultação da alocação e os itens “cegamento de participantes e pessoal” e “cegamento da avaliação do resultado” foram classificados como alto risco de viés (Figuras 13 e 14).

FIGURA 13 – GRÁFICO DO RISCO DE VIÉS PARA ESTUDO DE INTERVENÇÃO EM HUMANO



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 14 – RESUMO DOS RESULTADOS DO CONSENSO DAS AVALIAÇÕES DE RISCO DE VIÉS PARA O ESTUDO EM HUMANO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Para cada domínio desta ferramenta (linha) os estudos (colunas) obtiveram uma resposta positiva quando cumpriam o quesito do domínio (círculos em verde), negativa quando não cumpriam os quesitos (círculos em vermelho) ou não foram encontradas referências ou as mesmas não foram completamente claras no estudo para um determinado domínio (círculos em amarelo).

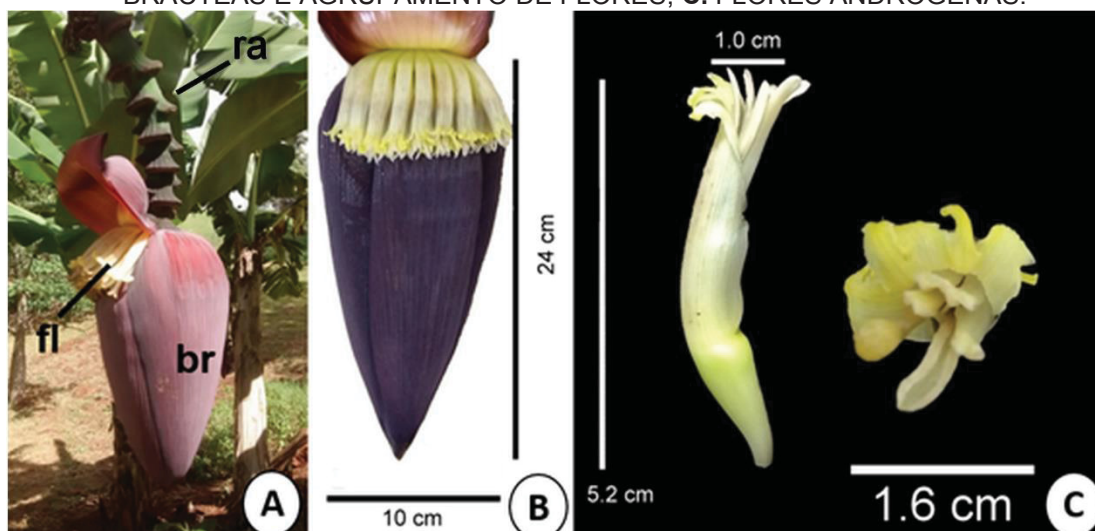
4.2 ESTUDO MORFO-ANATÔMICO

Sabendo-se que existem muitos cultivares dentro do gênero *Musa* devido a reprodução vegetativa generalizada e a ocorrência natural de muitos híbridos em todo o mundo (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007), é importante que se determine o máximo de características que possam contribuir com a identificação do material vegetal em estudo. Uma das formas de se caracterizar um vegetal é através da identificação de peculiaridades morfo-anatômicas, por exemplo. Em relação a informações sobre a morfo-anatomia das inflorescências de *Musa* spp., poucos estudos são reportados na literatura (ABBAS et al., 2015; FINGOLO et al., 2012; OSUJI, 2006; WHITE, 1928). Nesse contexto, com o objetivo de se determinar características da inflorescência utilizada nesse estudo, realizou-se um estudo morfo-anatômico das flores e brácteas coletadas.

Para o estudo morfo-anatômico foram analisados cortes de brácteas externas e internas e cortes de flores externas, intermediárias e internas, de forma a contemplar possíveis flores andrógenas e estaminadas.

As brácteas estão distribuídas pelo racimo em espiral, são ovais e alongadas. As folhas medem 17,0-25,0 cm de comprimento e 12,0-14,0 cm de largura, são invaginantes e paralelinérveas (Figura 15A, B). Quando frescas, as brácteas mais externas são de cor roxa intensa na face adaxial e de cor avermelhada na face abaxial, e as internas são de coloração roxo avermelhado na face adaxial e laranja para amarelo na face abaxial.

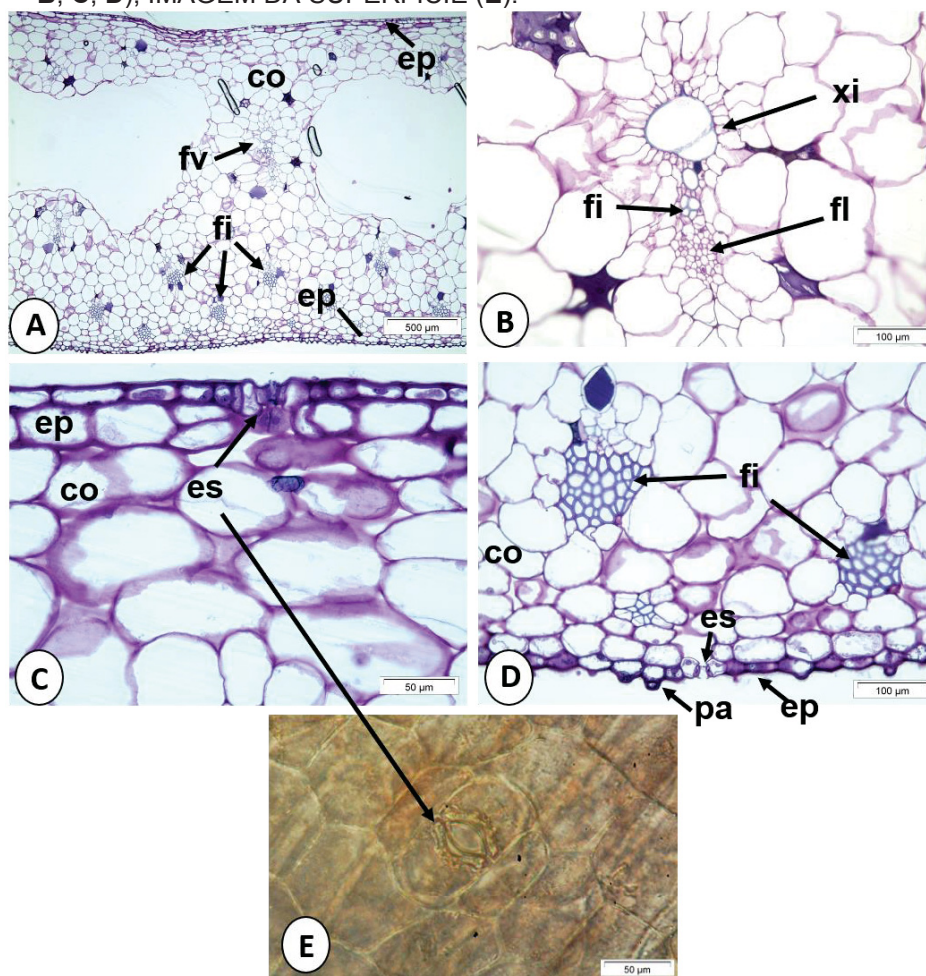
FIGURA 15 – MORFOLOGIA DA *Musa x paradisiaca* L. **A.** INFLORESCÊNCIA NA BANANEIRA INDICANDO FLORES (fl), BRÁCTEAS (br) e RAQUIS (ra); **B.** DETALHES DAS BRÁCTEAS E AGRUPAMENTO DE FLORES; **C.** FLORES ANDRÓGENAS.



FONTE: O autor (2018).

As brácteas são anfiestomáticas (Figura 16C, D) e apresentam paredes anticlinais retas e finas em ambas as faces. Na face adaxial, a epiderme é uniestratificada, com estômatos tetracíticos (Figura 16E). A face abaxial também possui epiderme uniestratificada, com estômatos tetracíticos e papilas (Figura 16D). De acordo com o estudo de Osuji (2006), a presença de estômatos tetracíticos em ambas as faces é característico em diversos cultivares de *Musa* spp. No entanto, não houve concordância em relação a presença de papilas, já que Osuji (2006) descreve a ausência de papilas na face abaxial em *M. paradisiaca* como uma característica diferencial entre os cultivares pertencentes ao grupo AAB (ausência de papilas) e AAA (presença de papilas) (OSUJI, 2006). O aspecto papiloso também foi encontrado na epiderme de *M. acuminata* Colla (FINGOLO et al., 2012). Também não foi identificado tricoma na epiderme, como descrito no estudo realizado por Abbas et al. (2015).

FIGURA 16 – ANATOMIA DAS BRÁCTEAS DE *Musa x paradisiaca* L. SECÇÕES TRANSVERSAIS (A, B, C, D); IMAGEM DA SUPERFÍCIE (E).



FONTE: O autor (2018).

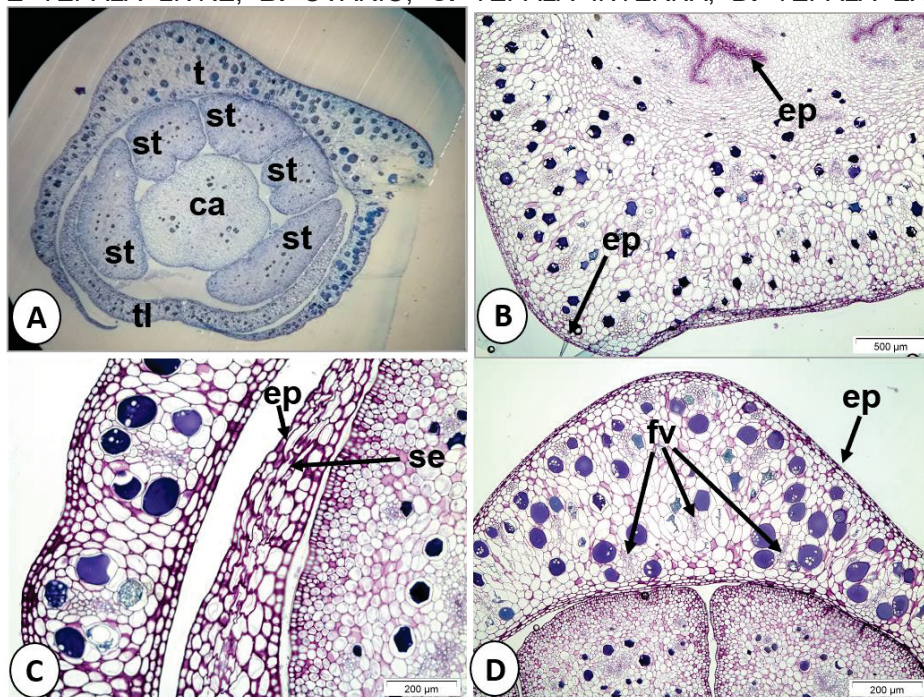
NOTA: co, colênquima; ep, epiderme; es, estômato; fv, feixe vascular; fi, fibras; fl, floema; pa, papila; xi, xilema.

O mesofilo é homogêneo, formado por células menores próximas às camadas epidérmicas e células maiores na região média, onde podem ser observadas câmaras de aeração com parênquima ramificado (Figura 16A). Pequenos feixes vasculares colaterais são imersos no mesofilo (Figura 16A, D). Essas características foram relatadas para *M. acuminata* (FINGOLO et al., 2012). As fibras são encontradas não apenas unidas ao floema (Figura 16B), mas também espalhadas no mesofilo (Figura 16D).

Cada bráctea cobre uma fileira de flores, sendo que o número de flores por fileira varia de 10 a 14 flores. As flores possuem 5 tépalas, de cor amarelo claro, são andrógenas, zigomorfas e homoclamídeas. As tépalas menores, internas, possuem mesofilo homogêneo, epiderme e hipoderme uniestratificada (Figura 17C). A externa, maior, possui epiderme pluriestratificada, mesófilo homogêneo, parenquimático e

feixes vasculares colaterais (Figura 17D). Os feixes localizam-se mais próximos da face abaxial, alinhados e de mesmo tamanho.

FIGURA 17 – ANATOMIA DAS FLORES E OVÁRIO DE *Musa x paradisiaca* L. – SECÇÕES TRANSVERSAIS. **A.** CARPELO (OVÁRIO TRILOCULAR), ESTAMES (st), TÉPALAS E TÉPALA LIVRE; **B.** OVÁRIO; **C.** TÉPALA INTERNA; **D.** TÉPALA EXTERNA.

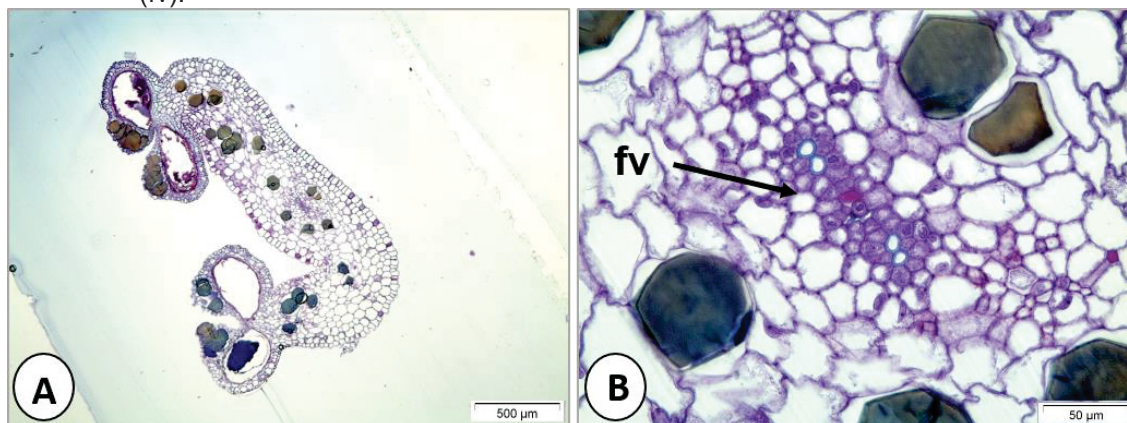


FONTE: O autor (2018).

NOTA: ca, carpelo; ep, epiderme; fv, feixe vascular; se, camada subepidérmica, st, estame; t, tépalas; tl, tépala livre.

As anteras são tetraesporangíadas e os lóculos estão separados pelo septo (Figura 18A). Na região do conectivo, epiderme e feixe vascular único e colateral (Figura 18B). A região dos sacos de pólen (Figura 18A) apresentou epiderme unisseriada com células arredondadas, endotécio com anel espessante e camadas internas colapsadas. Alguns grãos esféricos de pólen são visíveis.

FIGURA 18 – ANATOMIA DA ANTERA DE *Musa x paradisiaca* L. – SECÇÕES TRANSVERSAIS. **A.** ANTERA TETRAESPORANGIADA; **B.** REGIÃO DO CONECTIVO E FEIXE VASCULAR (fv).



FONTE: O autor (2018).

Em relação ao ovário, este é ínfero, trilocular e tanto a epiderme externa como a interna são uniestratificadas (Figura 17A, B), concordando com dados descritos na literatura (ABBAS et al., 2015; KIRCHHOOF, 1992). Não foram observados óvulos nas amostras analisadas, indicando a não funcionalidade do gineceu.

4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

De forma a conhecer as classes presentes no material vegetal, inicialmente foi conduzida a prospecção fitoquímica para flor e bráctea de *M. paradisiaca*. Os resultados da avaliação qualitativa de grupos presentes nas flores e brácteas de *M. paradisiaca* indicaram a presença de flavonoides, incluindo derivados antociânicos nas brácteas, e taninos no material vegetal, corroborando com os resultados da literatura (BHASKAR et al., 2012; GANUGAPATI, BALDWA; LALANI, 2012; KITDAMRONGSONT et al., 2008; SHENG et al., 2014) (Quadro 7).

QUADRO 7 – RESULTADOS DAS ANÁLISES QUALITATIVAS DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE FLORES E BRÁCTEAS DE *M. x paradisiaca*

Grupo	Reação	Flor	Bráctea
Alcalóides	Reativo Dragendorff	-	-
	Reativo Mayer	-	-
	Reativo Bouchardt/Wagner	-	-
	Reativo Ácido fosfomolibidico	-	-
	Reativo Ácido tânico	-	-
	Reativo Ácido pícrico	-	-
Flavonóides	Reação de Shinoda	-	+
	Reação de cloreto férrico	+(verde)	+(verde)
	Reação de cloreto de alumínio	+	+
Antraquinonas	Livres	-	-
	Glicosídeos/ dímeros	-	-
Taninos	Reação de gelatina	+	+
	Reação de cloreto férrico	+(azul: hidrolisáveis)	+(azul: hidrolisáveis)
	Reação de acetato de chumbo	+	+
	Reação de Stiasny – taninos hidrolisáveis	+	+
	Reação de Stiasny – taninos condensados	+	+
Saponinas		-	-

Fonte: O autor (2018).

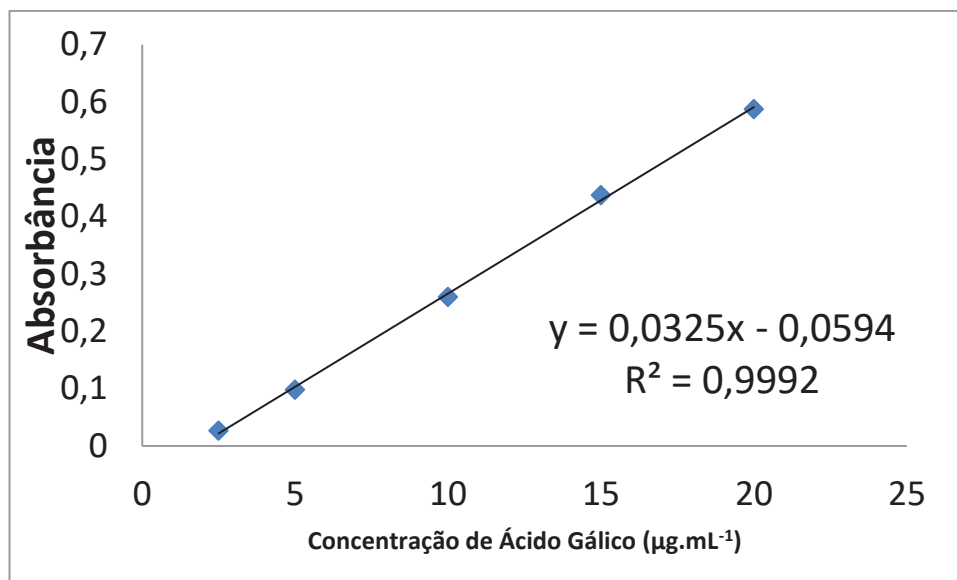
4.4 AVALIAÇÃO DE SOLVENTES NA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS FLORES E BRÁCTEAS

Os compostos fenólicos são normalmente encontrados sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo solúveis em água e solventes orgânicos polares. De acordo com a revisão sistemática realizada nesse trabalho (item 4.1), para avaliação de atividade antidiabética do gênero *Musa* são empregados para o preparo dos extratos principalmente os solventes etanol, metanol e água. Baseando-se nessas informações, esses solventes foram avaliados em relação a extração de compostos fenólicos de flores e brácteas utilizando o planejamento experimental do tipo centroide simplex.

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965) com

modificações, utilizando uma curva de calibração construída com padrão de ácido gálico (Figura 19).

FIGURA 19 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO ÁCIDO GÁLICO E EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS



Fonte: O autor (2018).

As concentrações de compostos fenólicos totais nos extratos foram calculadas segundo a equação da reta e adicionadas ao programa Statistica, obtendo-se os valores de média, desvio-padrão e a construção da superfície de resposta. As médias encontradas variaram desde a maior concentração, $0,4051 \pm 0,0241$ g EAG/100 g de flor seca com a mistura etanol e água, a menor concentração, $0,0073$ g EAG/100 g de flor seca para o solvente puro etanol (Tabela 1).

TABELA 1 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (EQUIVALENTE EM ÁCIDO GÁLICO – EAG) EXTRAÍDOS DA BRÁCTEA E FLOR DE *M. x paradisiaca* OBTIDA PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

Extrato	Concentração (g EAG.100 g ⁻¹ de planta seca)	
	Média ± DP (n = 2)	
	Bráctea	Flor
M	0,2449 ± 0,0156	0,1160 ± 0,0005
E	0,0937 ± 0,0001	0,0073 ± 0,0000
A	0,1473 ± 0,0064	0,1899 ± 0,0099
ME	0,1259 ± 0,0040	0,0181 ± 0,0019
AM	0,1764 ± 0,0089	0,3195 ± 0,0219
AE	0,2374 ± 0,0026	0,4051 ± 0,0241
PC	0,1832 ± 0,0038	0,3795 ± 0,0248
MAE	0,2089 ± 0,0064	0,2265 ± 0,0010
EAM	0,1848 ± 0,0085	0,2561 ± 0,0068
AME	0,1563 ± 0,0025	0,3538 ± 0,0107

FONTE: O autor (2018).

NOTA: DP, desvio padrão; A, água; M, metanol; E, etanol; AM, água e metanol (1/2:1/2, v/v); AE, água e etanol (1/2:1/2, v/v); ME, metanol e etanol (1/2:1/2, v/v); AME, água, metanol e etanol (2/3:1/6:1/6, v/v/v); MAE, metanol, água e etanol (2/3:1/6:1/6, v/v/v); EAM, etanol, água e metanol (2/3:1/6:1/6, v/v/v); PC, ponto central – água, metanol e etanol (1/3:1/3:1/3, v/v/v).

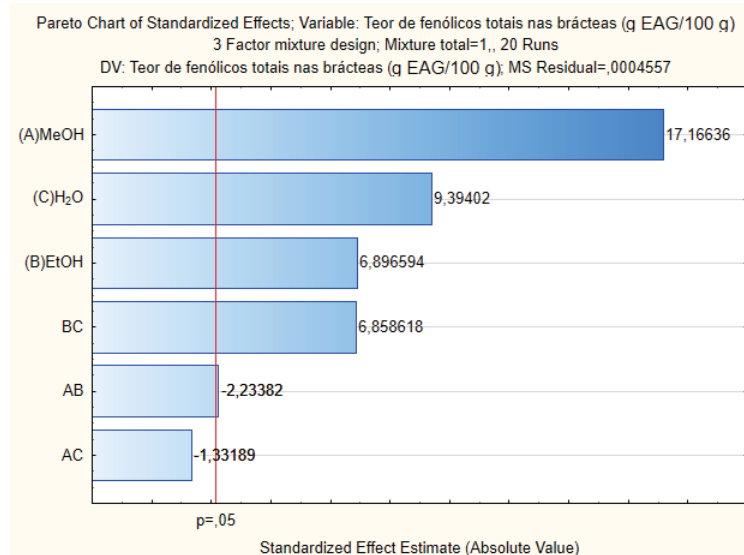
Para a construção da superfície de respostas, foram testados os diferentes modelos (linear, quadrático e cúbico especial), buscando-se aquele que fornece um ajuste adequado aos dados obtidos. A escolha do modelo foi baseada principalmente em dois testes de ANOVA: o primeiro, *Sequential fit of models of increasing complexity*, realiza uma comparação entre os modelos de forma hierárquica, indicando o modelo com maior número de termos significantes, ou seja, o de maior ordem; o segundo, *Lack of fit*, avalia se há diferença estatística significativa entre a falta de ajuste e o erro puro, ou seja, indica se o modelo está ajustado adequadamente.

Para os extratos da bráctea, quando avaliado o modelo linear, verificou-se que não há diferença estatística significativa ($F_{(2,17)} = 3,22$; $p = 0,0653$). Já com a adição dos parâmetros quadráticos, houve significância estatística ($F_{(3,14)} = 18,03$; $p < 0,05$). No entanto, ao se adicionar os parâmetros do modelo cúbico especial, não houve melhora significativa no ajuste da superfície de resposta ($F_{(1,13)} = 0,0006$; $p = 0,9940$), sendo escolhido, então, o modelo quadrático. Valores altos de R^2 (0,8507) e R^2 ajustado (0,7975) são obtidos com este modelo, o que pode ser interpretado como uma boa correlação entre resposta e variáveis.

A Figura 20 mostra os efeitos para esse modelo. Pode-se observar que os efeitos de interação dos componentes não são importantes, exceto a interação água

e etanol, prevalecendo os componentes puros da mistura como significativos, ou seja, considerados de forma pura, todos os 3 componentes são significativos.

FIGURA 20 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS PARA RESPOSTA DE TEOR COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA BRÁCTEA

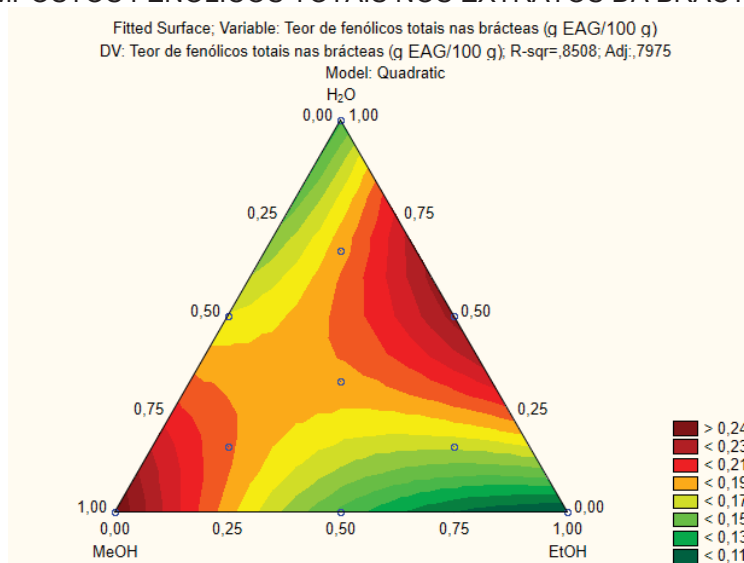


FONTE: O autor (2018).

NOTA: (A)MeOH, metanol; (B)EtOH, etanol; (C)H₂O, água; BC, etanol e água (1:1, v/v); AB, metanol e etanol (1:1, v/v); AC, metanol e água (1:1, v/v).

A Figura 21 mostra as curvas de nível das respostas obtidas com a utilização desse modelo. Observa-se que os melhores resultados considerando misturas foram obtidos com água e etanol na proporção 1:1 (v/v) ou uso do solvente puro metanol.

FIGURA 21 – CURVA DE NÍVEL DO MODELO QUADRÁTICO PARA RESPOSTA TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA BRÁCTEA

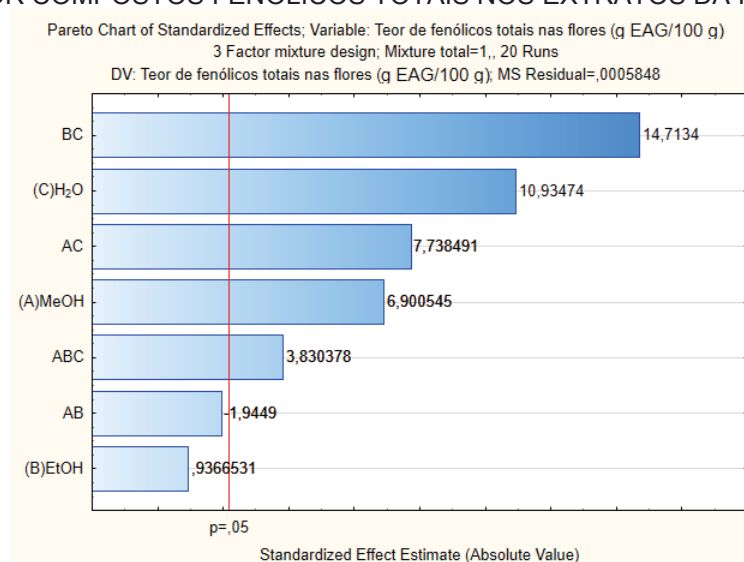


FONTE: O autor (2018).

Para os extratos da flor, quando avaliado o modelo linear, quadrático e especial cúbico, foi constatada diferença estatística significativa para todos os modelos ($F_{(2,17)} = 3,73$; $p = 0,0452$; $F_{(3,14)} = 70,67$; $p = 1,6 \times 10^{-8}$; $F_{(1,13)} = 14,67$; $p = 0,0020$, respectivamente). Comparando-se os valores de R^2 e R^2 ajustado, escolheu-se o o modelo especial cúbico (0,9798 e 0,9705, respectivamente).

Analisando o gráfico abaixo (Figura 22), dos compostos puros somente a água e o metanol são significativos, isto quer dizer que o emprego do etanol puro resulta em uma extração não significativa. No entanto, a mistura de etanol e água tem uma contribuição muito importante para a extração dos compostos fenólicos.

FIGURA 22 – GRÁFICO DE PARETO DOS EFEITOS PADRONIZADOS PARA RESPOSTA DE TEOR COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA FLOR

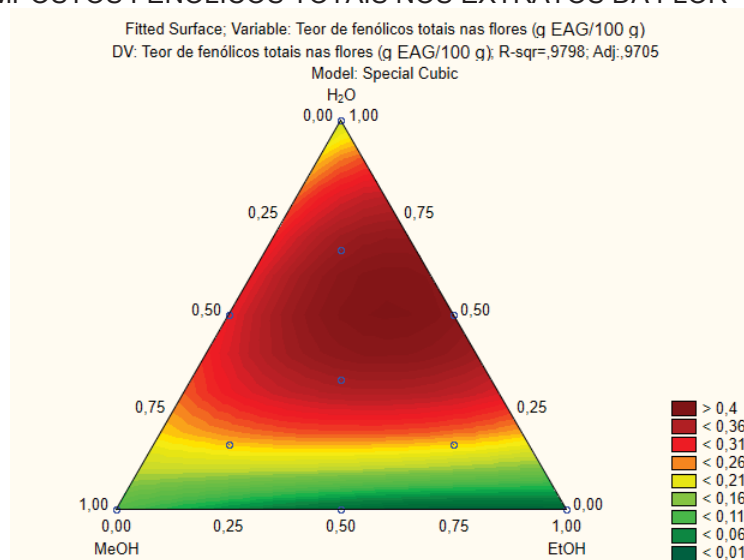


FONTE: O autor (2018).

NOTA: (A)MeOH, metanol; (B)EtOH, etanol; (C)H₂O, água; BC, etanol e água (1:1, v/v); AB, metanol e etanol (1:1, v/v); AC, metanol e água (1:1, v/v); ABC, metanol, etanol e água (1:1:1, v/v/v).

Analisando a superfície de resposta a seguir (Figura 23), pode-se observar que a região de máximo está localizada próximo da reta água-etanol, indicando que essa mistura foi a melhor composição obtida para extração dos compostos fenólicos das flores.

FIGURA 23 – CURVA DE NÍVEL DO MODELO ESPECIAL CÚBICO PARA RESPOSTA TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DA FLOR



FONTE: O autor (2018).

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

4.5.1 Rendimento dos extratos e frações metanólicas

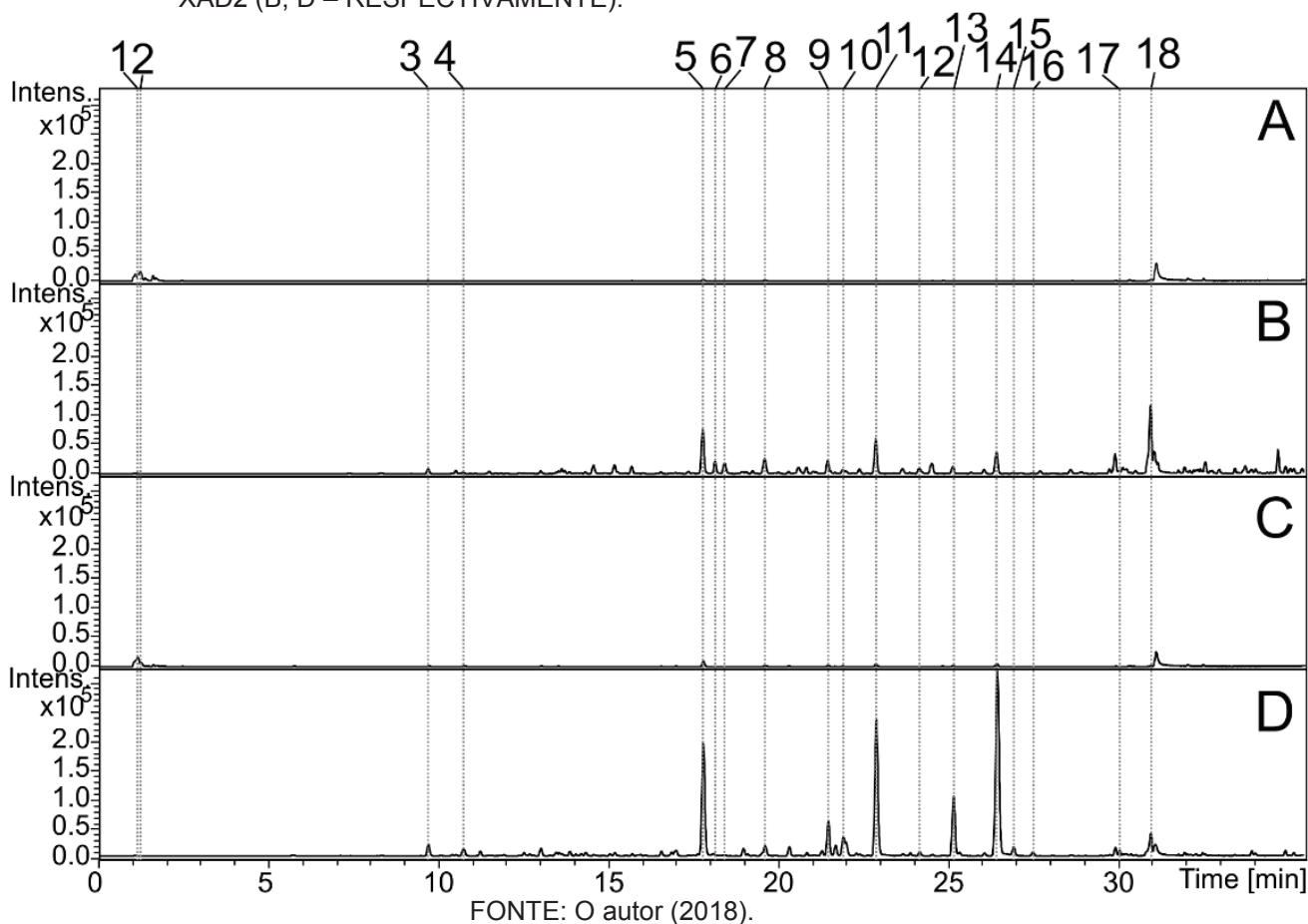
A partir das massas obtidas após pesagem dos extratos brutos e frações metanólicas, os rendimentos foram calculados. Para o EAB e EAF foram obtidos rendimentos iguais a 15,9 % e 18,1 % (em relação a planta estabilizada), respectivamente. Já para a FMB e FMF, obtiveram-se rendimentos iguais a 3,2 % e 6,7 % (em relação ao extrato aquoso). Os extratos hidroetanólicos apresentaram rendimentos iguais a 9,9 % e 10,9 % para flores e brácteas, respectivamente. Para os extratos preparados em acetona, metanol, os rendimentos obtidos foram: 11,2 % e 10,8 %; 8,5 % e 8,3 %; para flores e brácteas, respectivamente.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DOS EXTRATOS

4.6.1 Identificação dos constituintes dos extratos aquosos e frações de *M. x paradisiaca* por CLAE-DAD-EM

Os constituintes dos extratos de *M. x paradisiaca* foram identificados através da comparação dos dados de UV, EM e EM/EM com dados descritos na literatura. Foram identificados 15 compostos a partir dos extratos utilizados no tratamento dos animais, sendo esses os extratos aquosos das brácteas e das flores, bem como os mesmos extratos após remoção dos açúcares por Amberlite XAD-2 (Figura 24, Quadro 8).

FIGURA 24 – CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS (MODO NEGATIVO) DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS BRÁCTEAS (A) E DAS FLORES (C), E DOS EXTRATOS DAS BRÁCTEAS E DAS FLORES APÓS REMOÇÃO DOS AÇÚCARES POR AMBERLITE XAD2 (B, D – RESPECTIVAMENTE).



QUADRO 8 – IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES PRESENTES NOS EXTRATOS DE *M. x paradisiaca* POR CLAE-DAD-EM.

PICO	TR (min)	COMPOSTO	UV (nm)	FM	NEGATIVO (m/z)	
					EM [M-H] ⁻	EM/EM
1	1.1	Ácido quínico Hexose	-	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.0568	-
2	1.2		-	C ₆ H ₁₂ O ₆	179.0566	-
3	9.6	Ácido di-O-hexosil cumárico NI	299, 312	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	487.1488	163
4	10.7		285	C ₁₂ H ₁₃ NO ₃	218.0832	216, 188, 162
5	17.8	Ácido di-O-acetil di-O-hexosil cumárico O-hexosil-deoxihexosil quercetina	299, 313	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅	571.1695	487, 341, 307, 163, 145
6	18.1		260, 352	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1482	300, 271, 255, 179
7	18.4	NI Ácido nonanedioico	299, 325	C ₁₇ H ₁₆ O ₁₀	379.0697	185
8	19.6		-	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.0989	-
9	21.5	Ácido tri-O-acetil di-O-hexosil cumárico	299, 313	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₆	613.1803	383, 341, 307, 163, 145
10	21.9		299, 313	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₆	613.1803	383, 341, 307, 163, 145
11	22.9	Ácido tri-O-acetil di-O-hexosil cumárico Ácido tetra-O-acetil di-O-hexosil cafeico	299, 313	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₆	613.1794	341, 323, 163, 145
12	24.2		299, 325	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₈	671.1856	383, 179, 163
13	25.1	Ácido tetra-O-acetil di-O-hexosil cumárico	299, 313	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₇	655.1872	425, 383, 341, 163, 145
14	26.4		299, 312	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₇	655.1906	383, 341, 163, 145
15	29.5	Ácido tetra-O-acetil di-O-hexosil cumárico Ácido tetra-O-acetil di-O-hexosil O-metil cafeico	299, 313	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₇	655.1911	383, 341, 323, 163, 145
16	27.5		299, 325	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₈	685.2023	193, 175, 160
17	30.0	NI Ácido penta-O-acetil di-O-hexosil cumárico	299, 313	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₈	697.2022	425, 383, 163, 145
18	30.9		-	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.2351	229, 211, 183, 171

FONTE: O autor (2018).

NOTA: TR: tempo de retenção; FM: fórmula molecular; EM/EM, espectrometria de massas sequencial.

O procedimento de remoção dos açúcares dos extratos mostrou ser eficiente, sendo possível observar maiores intensidades dos picos cromatográficos nesses extratos quando foram analisados por CLAE-DAD-EM nas mesmas concentrações de 1 mg/mL (Figura 24).

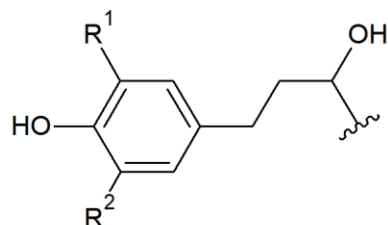
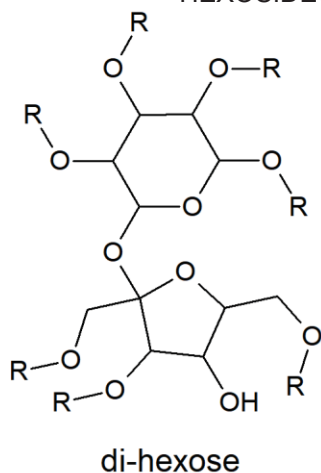
Os picos cromatográficos **3**, **5**, **9-11**, **13-15** e **17** revelaram bandas nos espectros de ultravioleta com comprimento de onda próximos a 299 e 310 nm, o que compatível com o cromóforo do ácido cumárico. Todos esses compostos revelaram íons fragmento de m/z 163 relativo a uma molécula de ácido cumárico através de perdas de duas hexoses (324 u – composto **3**) ou duas hexoses juntamente com dois (408 u – composto **5**), três (450 u – compostos **9 a 11**), quatro (508 u – compostos **13-15**) ou cinco (534 u -composto **17**) grupos acetil. O composto **5** mostrou o íon m/z 571.1695 $[M-H]^-$, o qual é relativo a fórmula molecular $C_{25}H_{32}O_{15}$, e mostrou também o íon fragmento de m/z 487 produzido a partir da perda de dois grupos cetenos (42+42 = 84 u) confirmando os substituintes acetil. Assim, foi possível identificar os compostos ácido di-O-hexosil cumárico (**3**), ácido di-O-acetil di-O-hexosil cumárico (**5**), ácido tri-O-acetil di-O-hexosil cumárico (**9-11**), ácido tetra-O-acetil di-O-hexosil cumárico (**13-15**) e ácido penta-O-acetil di-O-hexosil cumárico (**17**), sendo que os dados obtidos foram compatíveis com aqueles descritos na literatura (ZHANG et al., 2015).

Os picos **12** e **16** exibiram duas bandas nos espectros de UV com comprimentos de ondas próximos a 299 e 325 nm, sugerindo a presença do cromóforo do ácido cafeico. Esses compostos exibiram íons fragmentos de m/z 179 e 193 compatíveis com os ácidos cafeico e ferulico, respectivamente. A partir da comparação com dados já publicados as substâncias **12** e **16** foram identificadas como ácido tretra-O-acetil di-O-hexosil cafeico (**12**) (ABDALLAH, KAMEL; MOHAMED, 1994) e ácido tretra-O-acetil di-O-hexosil O-metil cafeico (**16**) (SHIROTA, SEKITA; SATAKE, 1997).

Esses compostos formados por hexoses acetiladas pertencem a classe dos fenilpropanoides glicosídeos. Possuem um núcleo de sacarose ligado a uma ou mais porções fenilpropanoil, as quais podem ser substituídas (ácido *p*-cumárico, ferúlico, cafeico) ou não (ácido cinâmico) (Figura 25). Nas últimas décadas, aproximadamente 150 compostos têm sido identificados em plantas pertencentes às famílias Arecaceae, Brassicaceae, Liliaceae, Polygonaceae, Polygalaceae, Rosaceae e Smilacaceae (PANDA, APPALASHETTI; JUDEH, 2011). Estes apresentam uma enorme diversidade em termos de natureza e posição das substituições desses compostos

com funções variadas, como inibidor de crescimento, inseticida, bactericida e precursores de flavorizantes (DAUDE, REMAUD-SIMEON; ANDRE, 2012).

FIGURA 25 – EXEMPLO DE ESTRUTURA DOS DERIVADOS DE FENILPROPANOIDES HEXOSÍDEOS

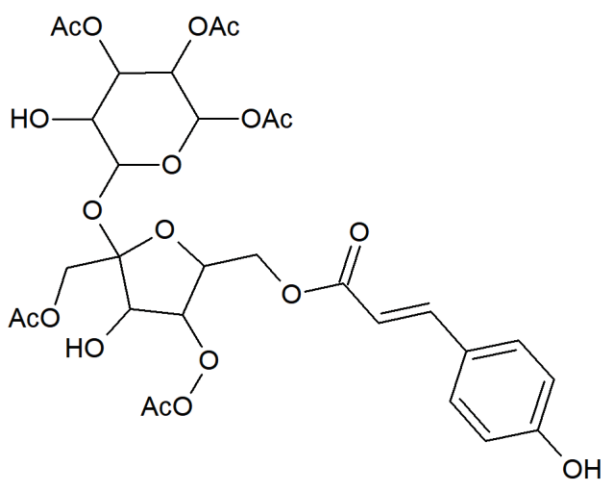


Porção fenilpropanoil:

p-cumárico $R^1 = R^2 = H$

ferúlico $R^1 = H$ $R^2 = OCH_3$

cafeico $R^1 = OH$ $R^2 = H$



Prunose I (ZHANG et al., 2015)

(ex. de ácido penta-O-acetil di-O-hexosil cumárico)

FONTE: O autor (2018).

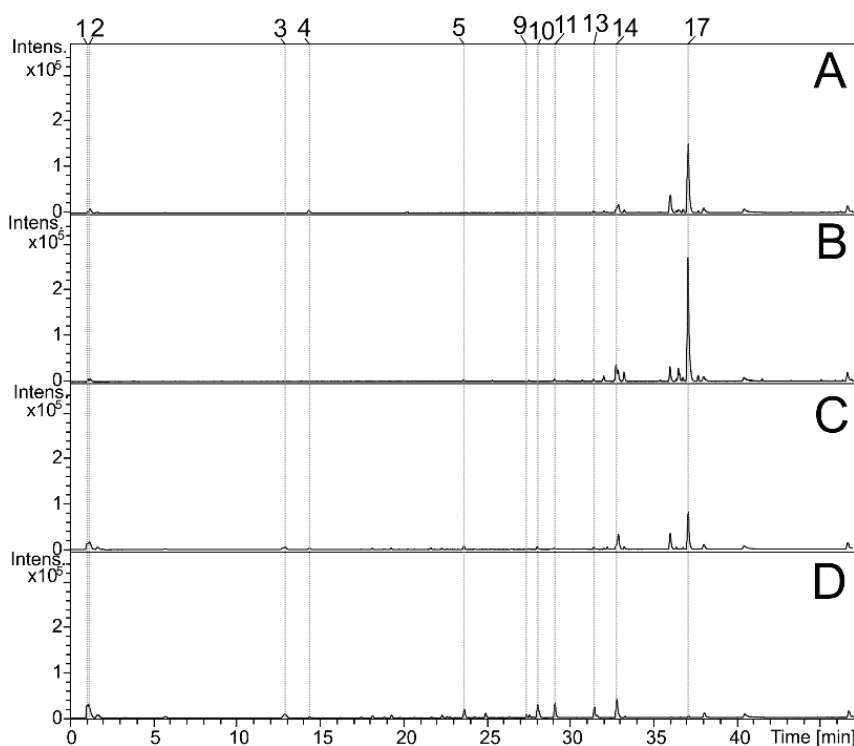
Além dos compostos descritos, também foi possível identificar um flavonol glicosilado, O-hexosil-deoxihexosil quercetina (**6**), ácido quínico (**1**), hexose (**2**) e o ácido nonanedioico (**8**).

4.6.2 Comparação da composição química dos extratos da bráctea e flor de *M. x paradisiaca* CLAE-DAD-EM

Os extratos das flores e brácteas de *M. x paradisiaca* obtidos com metanol, acetona, água e hidroetanólico 50 % foram analisados por CLAE-DAD-EM (Figuras 26 e 27). A partir dos extratos das flores, foi possível observar uma maior intensidade do pico **17** (ácido penta-*O*-acetil di-*O*-hexosil cumárico) quando extraído com acetona (Figura 26A). Além disso, também se observou que esta mesma substância se apresentou como um pico de intensidade muito inferior quando o extrato foi obtido com água. Entretanto, no extrato aquoso é possível observar maiores intensidades dos picos relativos aos derivados glicosilados do ácido cumárico, porém com números inferiores de grupos acetil em relação a substância **17**.

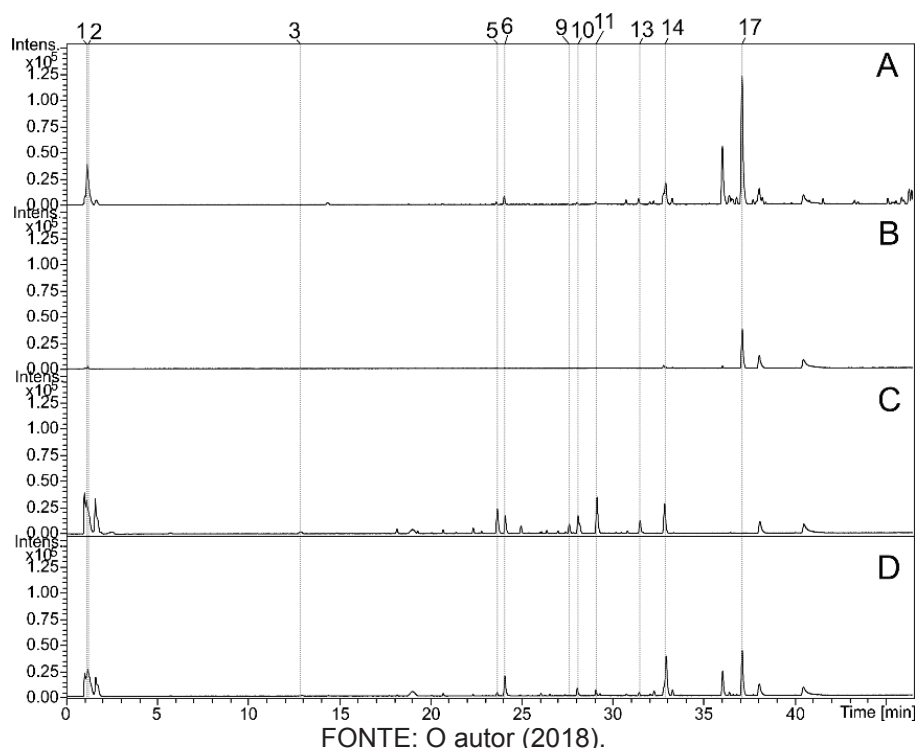
Esses mesmos resultados foram obtidos para os extratos provenientes das brácteas (Figura 27), o que sugere um perfil diferente de extração ou a ocorrência de hidrólise.

FIGURA 26 – CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS (MODO NEGATIVO) DOS EXTRATOS DAS FLORES DE *M. x paradisiaca* OBTIDOS COM METANOL (A), ACETONA (B), ETANOL 50 % (v/v) (C) E ÁGUA (D).



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 27 – CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS (MODO NEGATIVO) DOS EXTRATOS DAS BRÁCTEAS DE *M. x paradisiaca* OBTIDOS COM METANOL (A), ACETONA (B), ÁGUA (C) E ETANOL 50 % (v/v) (D).



4.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS NA VIA CLÁSSICA E ALTERNATIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO

Para a atividade dos extratos na via clássica e alternativa do sistema complemento foram escolhidos os extratos de flores e brácteas preparados em etanol 50 % (v/v) já que este mostrou extrair maiores quantidades de compostos fenólicos totais para flores e brácteas segundo os modelos obtidos no planejamento experimental (Figuras 21 e 23, item 4.4). Também foram avaliados os extratos preparados em água, pois este solvente é o comumente empregado no uso popular.

4.7.1 Titulação do *pool* de soro humano

Para determinação da diluição do *pool* de soro humano, uma série de diluições foram realizadas de forma a se encontrar a concentração capaz de hemolisar 50 % das hemácias. Dessa forma, a diluição para esse *pool* de soro foi 1:64 (v/v) para via clássica e 1:3 (v/v) para via alternativa. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - PORCENTAGEM DE HEMÓLISE PROVOCADA POR DIFERENTES DILUIÇÕES DE *POOL* DE SORO HUMANO (n = 3)

Diluição do Soro	% Hemólise Média (DPR %)	
	Via Clássica	Via Alternativa
1:2	102,2 (2,0)	22,8 (3,4)
1:3	-	51,8 (4,4)
1:4	98,7 (5,7)	63,1 (4,6)
1:8	94,6 (3,8)	96,4 (2,3)
1:16	95,3 (1,3)	97,3 (1,5)
1:32	76,5 (4,1)	97,2 (1,8)
1:64	52,1 (1,6)	97,4 (1,3)

FONTE: O autor (2018).

NOTA: DPR, desvio padrão relativo.

4.7.2 Ensaio hemolítico dos extratos

De forma a se definir a concentração de partida para a série de diluições dos extratos brutos a ser avaliada em relação à atividade na via clássica do sistema complemento, foi realizado um ensaio para verificar a capacidade de hemólise desses extratos. Entre a faixa avaliada (10 – 1000 µg/mL), concentrações ≤ 500 µg/mL de EAB e ≤ 1000 µg/mL de EAF, EEF e EEB apresentaram taxas abaixo de 4,8 % (próximas a taxa do controle de hemólise espontânea – 3,4 %). Portanto, essas concentrações foram escolhidas como ponto de partida para as séries de diluições dos extratos brutos, respectivamente.

4.7.3 Avaliação do efeito dos extratos aquosos e frações de brácteas e flores na imunomodulação da via clássica do sistema complemento

O efeito dos extratos EAF, EAB, EEF e EEB na imunomodulação da via clássica foram avaliados nas concentrações de 56,2-1000 µg/mL (EAF, EEF, EEB) e 28,1-500 µg/mL (EAB). Primeiramente, os valores de inibição da hemólise para os extratos e respectivas concentrações foram calculados utilizando a equação (3). A partir desses valores, foram construídas as curvas sigmóides e, por regressão logística, os ICH₅₀ foram determinados (Tabela 3). Pode-se observar que não houve um aumento dos valores de ICH₅₀ nos ensaios sem incubação prévia comparados aos valores obtidos com incubação prévia, indicando um efeito inibidor dos extratos, assim como para a heparina, conforme relatado na literatura (EDENS et al., 1994). O valor de ICH₅₀ para o controle heparina (31,11 µg/mL) foi muito próximo ao valor relatado em um estudo recente (34 µg/mL), confirmando uma adequada execução do ensaio (BOVO et al., 2016).

TABELA 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50 % DE HEMÓLISE INDUZIDA PELA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO DOS EXTRATOS DE *M. x paradisiaca* E HEPARINA

	Média ± dp (µg/mL) (n = 3)				
	EAF	EAB	EEF	EEB	Heparina
ICH ₅₀ com incubação	524,77 ± 11,48	390,67 ± 30,09	373,66 ± 4,78	162,11 ± 22,18	31,11 ± 1,66
ICH ₅₀ sem incubação	532,00 ± 12,83	387,33 ± 10,87	394,67 ± 12,39	124,33 ± 16,42	26,67 ± 3,94

FONTE: O autor (2018).

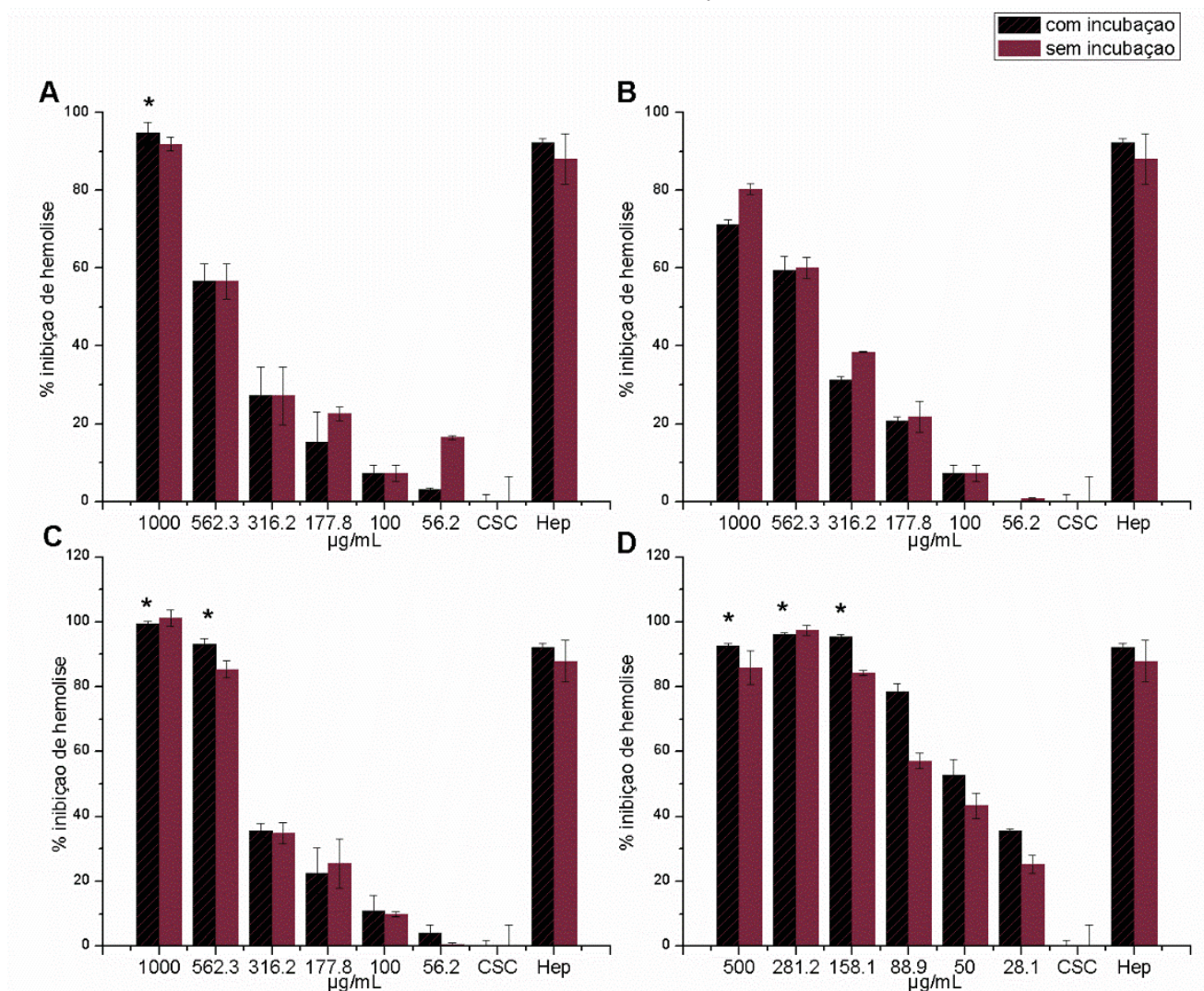
NOTA: EAF, extrato aquoso flor; EAB, extrato aquoso bráctea; EEF, extrato hidroetanólico 50 % (v/v) flor; EEB, extrato hidroetanólico 50 % (v/v) bráctea. dp, desvio padrão.

Na Figura 28 são apresentados os valores de inibição de hemólise pelos extratos comparados ao controle heparina (100 µg/mL). O EAF inibiu a hemólise significativamente na concentração de 1000 µg/mL e o EEF nas concentrações de 562,3 e 1000 µg/mL quando comparados a heparina, que é um inibidor de ativação do sistema complemento. Já o EAB não apresentou inibição significativa. Em contrapartida, o EEB inibiu significativamente a partir de 158,1 µg/mL e apresentou o menor valor de ICH₅₀, o que permite inferir que esse extrato possui uma melhor

atividade na inibição da via clássica do sistema complemento comparado com aos demais. Comparando-se esse valor de ICH_{50} com os encontrados na literatura para produtos naturais, pode-se considerar esses extratos como potentes inibidores. Por exemplo, o extrato de *Penthorum chinense* apresentou um ICH_{50} de 111,6 $\mu\text{g/mL}$ na inibição da via clássica (ZENG et al., 2013). Além disso, um estudo realizado por Zheng, Lu e Chen (2018) avaliaram ácidos fenilpropionícos isolados da *Polygonum chinense* e obtiveram ICH_{50} de 135 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido cafeico, 478 $\mu\text{g/mL}$ para o vanicosideo B e 493 $\mu\text{g/mL}$ para o lapatosideo C.

Ainda, comparando os resultados de ICH_{50} , conclui-se que os melhores resultados foram obtidos para os extratos hidroetanólicos. Essa observação pode ser relacionada com a maior concentração de compostos fenólicos totais utilizando essa mistura de solventes quando comparado a água pura (Figuras 21 e 23, item 4.4). Além disso, os extratos hidroetanólicos apresentam um pico de maior intensidade do fenilpropanoide hexosideo penta-acetilado (**17**), sugerindo sua relação a atividade imunomodulatória observada (Figuras 26 e 27, item 4.6.2).

FIGURA 28 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA HEMÓLISE DA VIA CLÁSSICA DO SISTEMA COMPLEMENTO SOB AÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE FLORES E BRÁCTEAS DE *M. x paradisiaca*.



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Extrato aquoso da flor (A) e bráctea (B); extrato hidroetanólico (50 %, v/v) da flor (C) e bráctea (D). CSC, controle de ativação do sistema complemento; Hep, heparina 100 µg/mL; *atividade inibidora equivalente a Hep ($p > 0,05$).

Um estudo realizado por Wang et al. (2003) mostrou que quatro ácidos fenilpropionícos hexosídeos isolados de *Bidens parviflora* apresentaram atividade inibidora de liberação de histamina em mastócitos de ratos induzidos por reação antígeno-anticorpo e inibição de prostaglandina E2 em macrófagos (células RAW 264.7) superior ao controle indometacina (anti-inflamatório não esteroide). Dessa forma, a presença de fenilpropanoides nos extratos pode estar envolvida na atividade inibidora a ativação da via clássica do sistema complemento.

A atividade imunomodulatória de extratos de *M. paradisiaca* foi avaliada recentemente por Correa et al. (2017). Entretanto, os extratos avaliados não

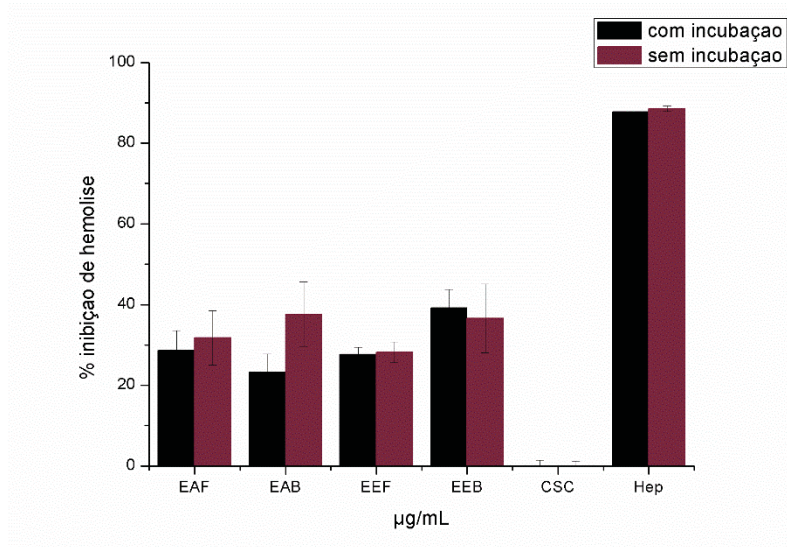
apresentaram efeito inibidor no ensaio da via clássica. Essa diferença nos resultados pode ser explicada pela forma de obtenção dos extratos e as características químicas da composição. Esse estudo avaliou extratos obtidos com fluido supercrítico, utilizando propano comprimido e dióxido de carbono como agentes extratores, o que favoreceu a extração de compostos apolares como triterpenos (CORREA et al., 2016).

4.7.4 Avaliação do efeito dos extratos aquosos e frações de brácteas e flores na imunomodulação da via alternativa do sistema complemento

O efeito das concentrações de 56,2-1000 µg/mL dos extratos EAF, EAB, EEF e EEB foram avaliados na imunomodulação da via alternativa do sistema complemento. Não foi observada uma relação dose-resposta com os valores de hemólise obtidos para as concentrações avaliadas dos extratos. Sendo assim, não foi possível calcular os valores de ICH_{50} para o ensaio hemolítico da via alternativa, apenas para o controle heparina, o qual foi de 130,6 µg/mL $\pm$ 3,9 % com incubação prévia e 128,4 µg/mL $\pm$ 3,5 % sem incubação prévia, confirmando sua ação inibidora. Esses valores foram semelhantes ao determinado em um estudo recente utilizando o mesmo ensaio hemolítico para via alternativa, o qual obteve ICH_{50} 163 µg/mL para heparina (BOVO et al., 2016).

Os valores de inibição de hemólise variaram de 11,6 % para EAF a 43,3 % para EEB. Na Figura 29 são apresentados os valores de inibição de hemólise pelos extratos na concentração de 316,2 µg/mL comparados ao controle heparina (316 µg/mL). Verifica-se uma baixa atividade de inibição para todos os extratos.

FIGURA 29 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA HEMÓLISE DA VIA ALTERNATIVA DO SISTEMA COMPLEMENTO SOB AÇÃO DOS EXTRATOS DE FLORES E BRÂCTEAS DE *M. x paradisiaca*.



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Dados expressos como média e desvio padrão (n = 3). EAF, extrato aquoso flor; EAB, extrato aquoso bráctea; EEF, extrato hidroetanólico 50 % (v/v) flor; EEB, extrato hidroetanólico 50 % (v/v) bráctea; CSC, controle de ativação do sistema complemento; Hep, heparina. Extratos e heparina na concentração de 316 µg/mL.

No estudo de Correa et al. (2017), os extratos de *M. paradisiaca* mostraram atividade inibidora de ativação da via alternativa nas concentrações de 5,3 a 333 µg/mL, apresentando taxas de inibição de pelo menos 76,42 %. Esses resultados foram relacionados e atribuídos a presença de altas concentrações de lupenona. As diferenças nos resultados podem ser justificadas pela composição química dos mesmos, assim como observado no ensaio da via clássica.

4.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS NA TOLERÂNCIA A GLICOSE ORAL E NÍVEIS GLICÊMICOS DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

Considerando que o uso popular da inflorescência para o tratamento do DM utiliza água nas preparações (KUMAR et al., 2012; SWATHI, JYOTHI; SRAVANTHI, 2011), foram escolhidos os extratos aquosos para avaliação no modelo de ratos diabéticos induzidos por STZ.

Vale ressaltar que nenhum estudo identificado na revisão sistemática avaliou o efeito das brácteas em modelo animal. A bráctea é uma parte da inflorescência normalmente descartada nos estudos, avaliando-se apenas as flores. No entanto, esta faz parte da inflorescência e pode apresentar um potencial antidiabético assim como as flores e demais partes do vegetal. Segundo as análises de caracterização dos extratos aquosos e frações, o EAB e FMB apresentam compostos em comum aos das flores (EAF e FMF), como os ácidos fenilpropionícos hexosídeos. Além disso, as brácteas apresentam outros diferentes compostos já relatados na literatura como as antocianinas, as quais estão relacionadas a efeitos antidiabéticos (GUO; LING, 2015; KITDAMRONGSONT et al., 2008). Dessa forma, torna-se interessante a avaliação dos extratos aquosos das brácteas no modelo animal.

4.8.1 Pareamento dos grupos

Para comparação temporal intergrupos dos efeitos causados pelos tratamentos é importante garantir que no início do experimento não haja diferenças de peso corporal e níveis glicêmicos entre os grupos. Por isso utilizou-se os valores individuais de glicemia e peso corporal para distribuição dos animais nos diferentes grupos de forma a resultar em valores médios semelhantes. Os valores médios de peso corporal e glicemia no início do experimento para os grupos são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DE GLICEMIA E PESO CORPORAL DOS GRUPOS NO INÍCIO DO EXPERIMENTO

Grupo	Glicemia (média n = 8)	Peso (média n = 8)
N	118,96	178,06
D	416,57	173,50
DINS	416,54	172,50
DEAB	415,10	169,88
DFMB	419,15	168,94
DEAF	418,39	174,81
DFMF	417,25	173,31
Dp-AC	416,89	172,56

FONTE: O autor (2018).

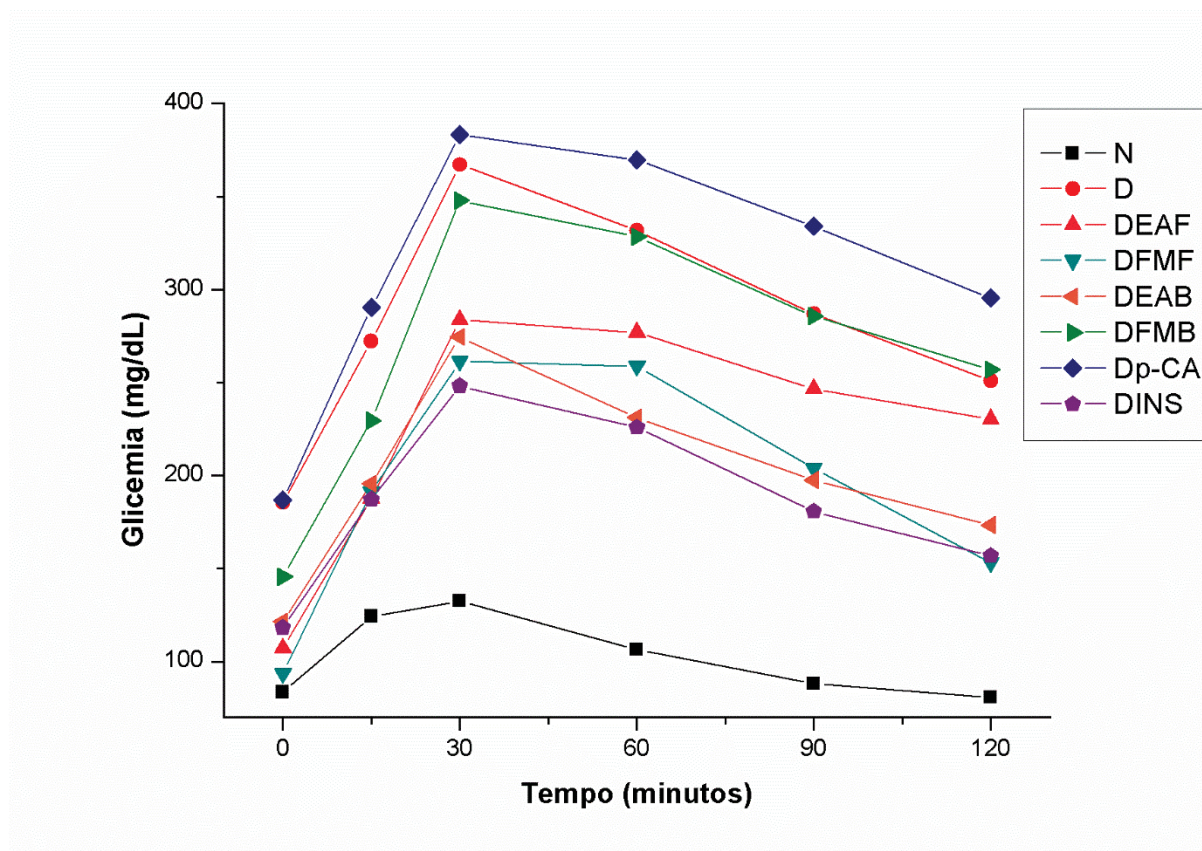
Nota: N, normal; D, diabético não tratado; DEAF, diabético tratado com extrato aquoso da flor; DFMF, diabético tratado com fração metanólica da flor; DEAB, diabético tratado com extrato aquoso da bráctea; DFMB, diabético tratado com fração metanólica da bráctea; Dp-CA, diabético tratado com ácido *p*-cumárico; DINS, diabético tratado com insulina.

4.8.2 Avaliação da tolerância à glicose oral

A administração da STZ destrói as células beta, causando diabetes insulina-dependente (tipo 1). Além disso, a STZ é capaz de inibir a secreção de insulina induzida pela glicose, pois provoca alterações nos mecanismos de sinalização celular (LENZEN, 2008). Portanto, é esperada uma anormalidade no perfil glicêmico dos animais diabéticos. Então, no 15º dia de tratamento, a fim de avaliar o efeito dos tratamentos com os extratos aquosos, frações metanólicas e ácido *p*-cumárico frente à homeostase da glicose, foi realizado o teste de tolerância à glicose oral, TTGO.

Nas Figuras 30, 31 e 32 são mostrados os resultados relacionados ao TTGO nos animais controles (grupos N e D) e animais que receberam os diferentes tratamentos (grupos DINS, DEAF, DFMF, DEAB, DFMB e Dp-CA).

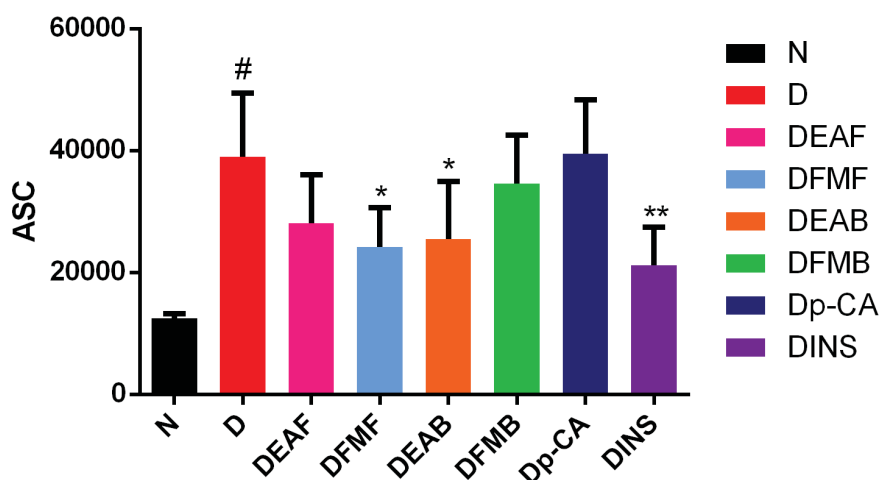
FIGURA 30 – CURVA DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE FLORES E BRÁCTEAS DE *M. x paradisiaca* DURANTE 15 DIAS



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Os dados estão expressos como médias ($n = 8$). N, normal; D, diabético não tratado; DEAF, diabético tratado com extrato aquoso da flor (200 mg/kg/dia); DFMF, diabético tratado com fração metanólica da flor (200 mg/kg/dia); DEAB, diabético tratado com extrato aquoso da bráctea (200 mg/kg/dia); DFMB, diabético tratado com fração metanólica da bráctea (200 mg/kg/dia); Dp-CA, diabético tratado com ácido *p*-cumárico (20 mg/kg/dia); DINS, diabético tratado com insulina (4 U/dia).

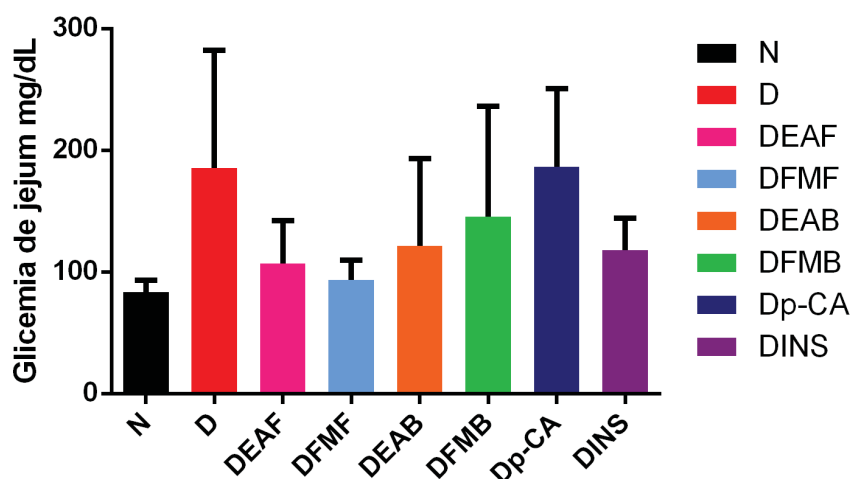
FIGURA 31 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS SOB A CURVA (ASC) DO TESTE DE TOLERÂNCIA ORAL À GLICOSE DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE FLORES E BRÁCTEAS DE *M. x paradisiaca* DURANTE 15 DIAS



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. *diferenças com D ($p < 0,05$); #, diferenças com N ($p < 0,05$). N, normal; D, diabético não tratado; DEAF, diabético tratado com extrato aquoso da flor (200 mg/kg/dia); DFMF, diabético tratado com fração metanólica da flor (200 mg/kg/dia); DEAB, diabético tratado com extrato aquoso da bráctea (200 mg/kg/dia); DFMB, diabético tratado com fração metanólica da bráctea (200 mg/kg/dia); Dp-CA, diabético tratado com ácido *p*-cumárico (20 mg/kg/dia); DINS, diabético tratado com insulina (4 U/dia).

FIGURA 32 – COMPARAÇÃO DA GLICEMIA DE 12h DE JEJUM DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE FLORES E BRÁCTEAS DE *M. x paradisiaca* DURANTE 15 DIAS



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e grupo D ($p > 0,05$). N, normal; D, diabético não tratado; DEAF, diabético tratado com extrato aquoso da flor (200 mg/kg/dia); DFMF, diabético tratado com fração metanólica da flor (200 mg/kg/dia); DEAB, diabético tratado com extrato aquoso da bráctea (200 mg/kg/dia); DFMB, diabético tratado com fração metanólica da bráctea (200 mg/kg/dia); Dp-CA, diabético tratado com ácido *p*-cumárico (20 mg/kg/dia); DINS, diabético tratado com insulina (4 U/dia).

No grupo D (diabéticos não tratados), observou-se tanto o aumento da glicemia de jejum como a intolerância à glicose quando comparado ao grupo N (normal), mostrando o modelo de DM nos animais induzidos com estreptozotocina (Figura 30). Analisando-se os valores de glicemia de jejum dos grupos tratados em comparação ao grupo D, não foi constatada diferença estatística significativa (Figura 32). No entanto, verifica-se uma redução da glicemia de jejum para todos os grupos tratados com extratos e frações, assim como para o grupo tratado com insulina (DINS).

Observando os perfis glicêmicos pós-sobrecarga apresentados na Figura 30, verifica-se uma redução na intolerância à glicose para os grupos que receberam o EAF, FMF, EAB e insulina. Ainda, no último tempo de avaliação após a sobrecarga oral de glicose (120 minutos), os níveis glicêmicos dos grupos tratados com EAB e FMF retornaram a valores próximos do grupo tratado com insulina.

Comparando-se as ASC dos diferentes grupos (Figura 31), constatou-se que os tratamentos FMF, EAB e insulina promoveram alterações estatisticamente significantes no perfil glicêmico pós-sobrecarga em relação ao grupo D, mostrando que esses tratamentos melhoraram a tolerância à glicose dos animais com DM induzido por STZ. Apesar do perfil glicêmico do grupo DEAF não apresentar diferença estatística significativa quando comparado ao grupo D, é importante destacar que até 60 minutos após a sobrecarga de glicose o perfil é muito semelhante ao dos grupos DINS, DFMF e DEAB, indicando o potencial desse extrato.

Relacionando esses resultados à composição química dos extratos, para as brácteas pode-se inferir que o potencial antidiabético dessa parte do vegetal pode ser atribuído a uma ação sinérgica dos componentes totais do extrato, já que o EAB promoveu uma melhora no perfil glicêmico pós-sobrecarga e glicemia de jejum superior a fração obtida com a amberlite XAD2 (FMB). Apesar desse procedimento ter concentrado os compostos majoritários do extrato, pode ser que outros compostos que contribuem para a ação antidiabética possam ter sido perdidos no procedimento de limpeza, uma vez que ele não é específico para a retirada de açúcares.

Como podemos observar nos cromatogramas da Figura 24 (item 4.6.1), após o procedimento com a amberlite houve um aumento da intensidade principalmente dos ácidos fenilpropanóides hexosídeos em comparação com o extrato aquoso. No entanto, comparando-se a intensidade dos picos da fração das brácteas (FMB) e da fração das flores (FMF), observa-se que a proporção desses compostos na fração das brácteas é cerca de 4 vezes menor que nas flores, sugerindo uma menor

concentração desses compostos acetilados no extrato das brácteas. Dessa forma, pode-se inferir que a concentração desses compostos no extrato aquoso da bráctea (menor em relação ao extrato das flores) pode ser reponsável pela não constatação de melhora da atividade pela fração (FMB). Ainda, considerando que a fração apresentou uma melhora na glicemia de jejum, pode ser que um tratamento utilizando doses maiores dessa fração que a avaliada nesse trabalho pudessem mostrar atividade significativa, não descartando o seu potencial.

O efeito do flavonol glicosídeo rutina nos níveis glicêmicos tem sido avaliado por estudos *in vitro* e *in vivo*. A atividade anti-hiperglicemiante em modelos de hiperglicemia aguda e crônica induzida por aloxana e de melhora no perfil glicêmico de ratos normoglicêmicos submetidos ao TTGO são um dos exemplos de atividade atribuída a doses de 30 mg/kg desse composto (CALZADA et al., 2017). Outros estudos mostram que a rutina assim como a quercetina e isoquercetina apresentam atividade inibidora *in vitro* de α -glicosidase (JO et al., 2009; SOHRETOGLU et al., 2018). Portanto, a presença do flavonol glicosídeo nos extratos de bráctea pode ter contribuído para os resultados observados.

As antocianinas, compostos presentes nas brácteas de *Musa* spp. (KITDAMRONGSONT et al., 2008), parecem atuar na prevenção ou reversão de processos patogênicos relacionados ao DM2 pela inibição do ganho de peso corporal, prevenção da produção de radicais livres e peroxidação lipídica, regulação da resposta inflamatória, redução dos níveis de glicose e lipídios no sangue e melhoria da resistência à insulina (GUO; LING, 2015). Dessa forma, esses compostos podem estar relacionados aos efeitos obtidos com o tratamento utilizando os extratos das brácteas.

Em relação às flores, o grupo tratado com a fração (FMF) obteve os melhores resultados comparado ao grupo tratado com o extrato bruto (EAF). Nos extratos das flores, foi observada uma maior intensidade dos picos dos ácidos fenilpropionícos hexosídeos (Figura 24, item 4.6.1), os quais mostraram-se ainda mais intensos após o procedimento de remoção de açúcares (FMF). Portanto, para essa parte do vegetal, pode-se inferir que a concentração dos compostos **5**, **9**, **10**, **11**, **13** e **14** está relacionada a atividade antidiabética apresentada.

Estudos tem mostrado que esses açúcares acetilados derivados do ácido p-cumárico possuem atividade antiagregante plaquetária (YOSHIKAWA et al., 2002) e atividade inibidora moderada da aldose redutase (FUJIMOTO et al., 2014;

NAKAMURA et al., 2013). Adicionalmente, atividade antioxidante tem sido relatada para compostos fenilpropionícos hexosídeos (KIEM et al., 2008; WANG, ZHANG; YANG, 2005).

Também foi observada para compostos pertencentes a esse grupo atividade inibidora de α -glicosidase, como o lapatosídeo D (FAN et al., 2010), e β -glicosidase, como o vanicosídeo A e B isolados da raiz da *Polygonum sachalinense* (KAWAI et al., 2006). Nesses estudos, além dos compostos glicosilados e acetilados foi avaliado também a porção fenilpropanoil das moléculas isoladamente – ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, que não apresentaram atividade. Dessa forma, os autores sugerem que a estrutura completa dos compostos está relacionada a ação, e não apenas os ácidos hidroxicinâmicos. Outro aspecto observado pelo estudo de Kawai et al. (2006) foi a atividade superior do composto vancosídeo B em relação ao A, sugerindo que a presença do grupo acetil em A possa reduzir a atividade inibitória.

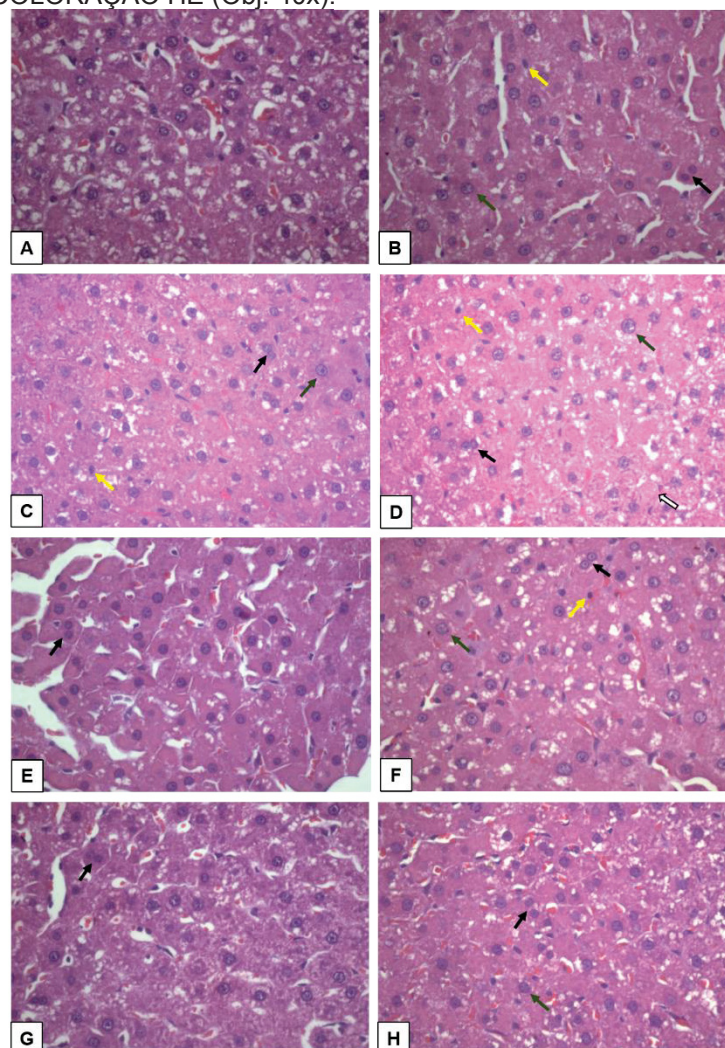
De forma similar, no presente estudo avaliou-se a atividade do ácido *p*-cumárico isoladamente com a finalidade de comparação da porção fenilpropanoil dos compostos identificados nos extratos das flores e brácteas de *M. x paradisiaca*. No entanto, a melhora da glicemia de jejum e intolerância à glicose não foi constatada para o grupo tratado com ácido *p*-cumárico, apesar da atividade anti-hiperglicemiante já ter sido relatada para esse composto isolado em estudo recente (AMALAN et al., 2016). Essa divergência de resultados pode ser decorrente de diferenças na concentração administrada e tempo de tratamento, o qual foi de 30 dias para o estudo de Amalan et al. (2016). Outra diferença entre os estudos é o veículo utilizado para administração do ácido *p*-cumárico. Por ser um composto de baixa solubilidade em água, neste estudo foi utilizada uma suspensão de carboximetilcelulose 1 % (*p/v*) como veículo aquoso, pois assim mantém-se o parâmetro de comparação com o veículo dos extratos, enquanto que Amalan et al. administrou o ácido *p*-cumárico em dimetilsulfóxido (DMSO).

4.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS NA HISTOLOGIA DE FÍGADO E RIM DE RATOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

4.9.1 Histologia do Fígado

A análise histopatológica mostrou que o grupo normal exibiu integridade celular e arquitetura lobular normais com veias centrais e cordões de hepatócitos separados por sinusoides sanguíneos. No grupo diabético não tratado (D), as alterações observadas no tecido hepático foram a intensa presença de binucleação e variação de tamanho dos núcleos (picnose e cariomegalia) nos hepatócitos (Figura 33). Essas alterações têm sido relatadas para modelos de DM1. (BILAL et al., 2016; PALMA et al., 2014).

FIGURA 33 – ACHADOS HISTOLÓGICOS EM FÍGADO DE RATO NORMAL (A), DIABÉTICO (B) E DIABÉTICO TRATADO DURANTE 15 DIAS COM ÁCIDO p-CUMÁRICO (DpAC) (C), INSULINA (D) E EXTRATOS DE *M. x paradisiaca*: EAB (E), FMB (F), EAF (G) E FMF (H). COLORAÇÃO HE (Obj. 40x).



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Binucleação (seta preta cheia); anucleação (seta preta vazada); picnose (seta amarela); cariomegalia (seta verde). EAB, extrato aquoso da bráctea; FMB, fração metanólica da bráctea; EAF, extrato aquoso da flor; FMF, fração metanólica da flor.

Para os grupos tratados com os extratos e frações assim como para o grupo tratado com insulina, foi observada uma redução da intensidade dessas alterações. Desses grupos, destacam-se os tratamentos DEAB, DFMB e DEAF que apresentaram melhor preservação do tecido hepático quando comparado ao grupo insulina (Quadro 9). Considerando que a hiperglicemia no DM é o principal mecanismo responsável pelo estresse oxidativo e aumento de espécies reativas de oxigênio que geram danos teciduais (PALMA et al., 2014), compostos que controlam a glicemia e que atuam como antioxidantes podem prevenir essas alterações. Dessa forma, os dados encontrados sugerem que, além do controle da glicemia (grupo DINS), a atividade

antioxidante dos extratos e fração pode ter uma importante contribuição na preservação do tecido hepático. Vale ressaltar que o grupo tratado com FMF (DFMF), apesar de ter mostrado um efeito antidiabético significativo nesses animais, não foi melhor que os demais extratos em relação a preservação do tecido hepático quando comparado ao grupo DINS.

Já para o grupo Dp-AC, houve a presença de hepatócitos anucleados e cariorrexe, indicando o não controle do dano tecidual hepático e, ainda, uma possível toxicidade, já que essas alterações não foram observadas no grupo diabético. Esse dado pode ser correlacionado com a não melhora na tolerância a glicose oral pelo ácido *p*-cumárico nessa concentração.

QUADRO 9 – ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE FÍGADO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE *M. x paradisiaca* DURANTE 20 DIAS

Alterações	Grupos							
	N	D	DINS	DEAB	DFMB	DEAF	DFMF	Dp-CA
Hepatócitos binucleados	-	++++	++	+	+	++	+++	+++
Picnose	-	++++	++	++	+	+	+	+++
Cariomegalia	-	++++	++	++	+	+	+	-
Cariorrexe	-	-	-	-	-	-	-	+++
Hepatócitos anucleados	-	-	-	-	-	-	-	+++

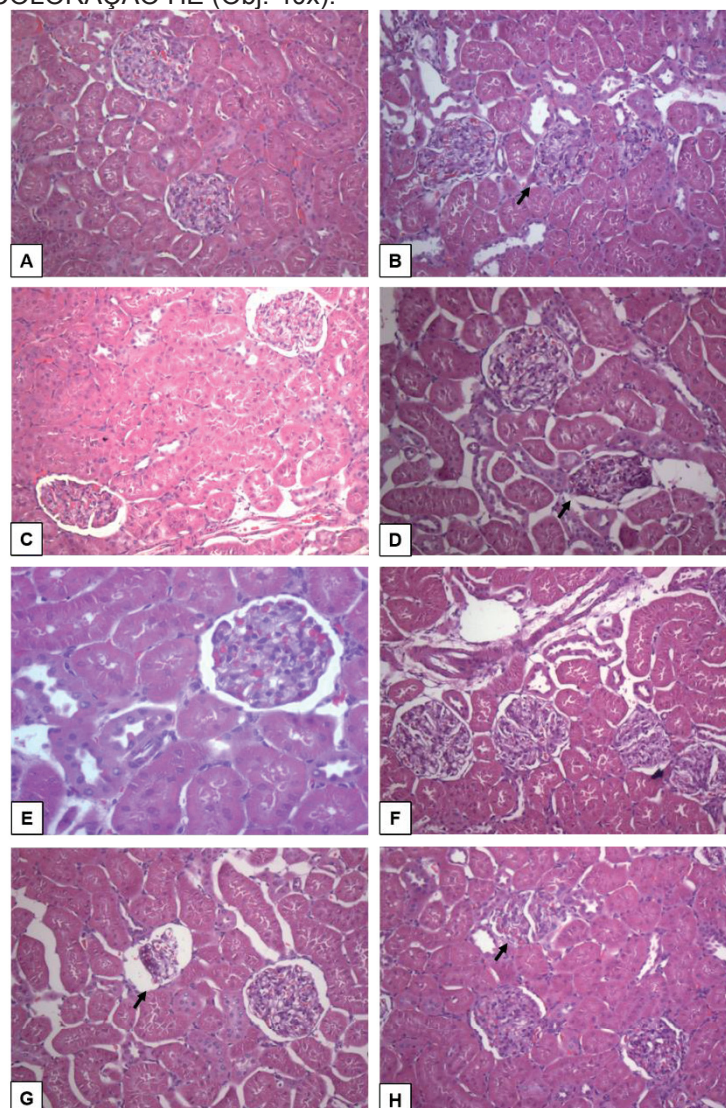
FONTE: O autor (2018).

NOTA: N, normal; D, diabético não tratado; DEAF, diabético tratado com extrato aquoso da flor (200 mg/kg/dia); DFMF, diabético tratado com fração metanólica da flor (200 mg/kg/dia); DEAB, diabético tratado com extrato aquoso da bráctea (200 mg/kg/dia); DFMB, diabético tratado com fração metanólica da bráctea (200 mg/kg/dia); Dp-CA, diabético tratado com ácido *p*-cumárico (20 mg/kg/dia); DINS, diabético tratado com insulina (4 U/dia).

4.9.2 Histologia do Rim

Para o tecido renal foram analisadas alterações nas regiões cortical e medular, como congestão celular, integridade dos glomérulos e da cápsula de Bowman, tamanho celular e tamanho dos núcleos e presença de células mononucleares. O grupo normal não apresentou nenhuma alteração, enquanto que no grupo diabético não tratado foram observadas alterações significativas na região cortical (congestão de células epiteliais planas, cápsula de Bowman não preservada (Figura 34), glomerulosclerose difusa) e região medular (hiperplasia de células da zona medular e presença de células mononucleares).

FIGURA 34 – ACHADOS HISTOLÓGICOS DE RIM DE RATO NORMAL (A), DIABÉTICO (B) E DIABÉTICO TRATADO DURANTE 15 DIAS COM ÁCIDO p-CUMÁRICO (C), INSULINA (D) E EXTRATOS DE *M. x paradisiaca*: EAB (E), FMB (F), EAF (G) E FMF (H). COLORAÇÃO HE (Obj. 40x).



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Cápsula de Bowman não preservada (seta preta). EAB, extrato aquoso da bráctea; FMB, fração metanólica da bráctea; EAF, extrato aquoso da flor; FMF, fração metanólica da flor.

Essas alterações podem ser associadas ao quadro de DM nesses animais. A nefropatia diabética é uma das complicações mais comuns decorrentes na hiperglicemia crônica. Os produtos finais de glicação promovem o estresse oxidativo excessivo no meio vascular e celular, que resulta em disfunção das células endoteliais, comprometendo a funcionalidade renal dos indivíduos diabéticos (SINGH, WINOCOUR; FARRINGTON, 2011).

Nos grupos tratados, observou-se uma redução dessas alterações ou até mesmo a não constatação das mesmas, conforme apresentado no Quadro 10. Entre

os tratamentos, destaca-se o DEAB o qual teve a região medular completamente preservada. Comparando este tratamento a insulina, verifica-se uma melhor resposta, sugerindo um mecanismo de preservação do tecido adicional ao controle da glicemia, como por exemplo a ação antioxidante. Esse efeito nefroprotetor foi constatado recentemente por Abbas et al. (2017), o qual observou que o extrato metanólico de brácteas de *M. x paradisiaca* (100 e 250 mg/kg) preveniu alterações histológicas e bioquímicas induzidas por gentamicina nos rins de camundongos. Ainda, em relação ao grupo DFMF, o qual, assim como o DEAB, apresentou melhora significativa na tolerância à glicose oral, pode-se destacar que o DEAB mostrou uma melhor preservação.

QUADRO 10 – ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DE RIM DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS E FRAÇÕES DE *M. x paradisiaca* DURANTE 20 DIAS

		Grupos							
Alterações		N	D	DINS	DEAB	DFMB	DEAF	DFMF	Dp-CA
Região cortical	Congestão de células epiteliais planas	-	++++	++	+	++	++	+++	++
	Cápsulas de Bowman não preservadas	-	++++	-	-	-	++	+++	++
	Glomerulosclerose difusa	-	++++	+++	-	-	++	-	-
Região medular	Hiperplasia de células da zona medular	-	++++	-	-	+	-	-	-
	Presença de células mononucleares	-	++++	-	-	++	++	++	+

FONTE: O autor (2018).

NOTA: N, normal; D, diabético não tratado; DEAF, diabético tratado com extrato aquoso da flor (200 mg/kg/dia); DFMF, diabético tratado com fração metanólica da flor (200 mg/kg/dia); DEAB, diabético tratado com extrato aquoso da bráctea (200 mg/kg/dia); DFMB, diabético tratado com fração metanólica da bráctea (200 mg/kg/dia); Dp-CA, diabético tratado com ácido p-cumárico (20 mg/kg/dia); DINS, diabético tratado com insulina (4 U/dia).

5 CONCLUSÃO

Uma vez identificados na revisão de literatura muitos artigos abordando a atividade antidiabética das espécies do gênero *Musa*, foi realizada uma revisão sistemática para a avaliação do potencial antidiabético das flores e brácteas de *Musa* spp. No total, 17 artigos que avaliaram a atividade antidiabética das flores de *Musa* spp. foram incluídos, não sendo identificados estudos avaliando as brácteas. Destes 17, apenas um estudo avaliou o efeito antidiabético em humanos, mas não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratado e controle. No entanto, a dose administrada pode ser considerada baixa (5 mL de extrato fresco) se comparada às doses em modelo animal. Já nos modelos diabéticos induzidos por animais, os extratos mostraram uma redução do nível glicêmico de forma dose dependente e com efeito equivalente a vários fármacos controle (por exemplo, insulina, glibenclamida, gliclazida e metformina). Além disso, a administração do extrato de *Musa* spp. foi capaz de reverter anormalidades nas ilhotas pancreáticas causada por níveis elevados de insulina. Estes efeitos observados são, provavelmente, devido à regulação de enzimas no metabolismo de carboidratos e fluxo gliconeogênico pelos componentes do extrato. Além disso, as propriedades antioxidantes dos extratos foram relacionadas a um efeito protetor contra os danos causados por indutores tóxicos do diabetes. Adicionalmente, estudos *in vitro* associaram os efeitos antidiabéticos dos extratos a um aumento na captação de glicose e inibição de enzimas de digestão de carboidratos. Em geral, resultados promissores em relação à atividade antidiabética foram encontrados para os extratos de flores de *Musa* spp.

Com o propósito de fornecer mais informações sobre o híbrido utilizado nesse estudo, as principais características morfo-anatômicas das brácteas e flores da *Musa* x *paradisiaca* coletadas no município de Morretes-PR são destacadas: brácteas com epiderme unisseriada, feixes de fibras próximas ao floema e distribuídos no mesófilo, estômatos tetracíticos em ambas as faces e presença de papilas; tépalas com epiderme pluriestratificada e feixes vasculares alinhados ao lado da face abaxial; anteras tetrasporangiais com feixe vascular único e colateral e ovário trilocular com epiderme unisseriada.

Na sequência, visando identificar o solvente que promovesse melhor extração de compostos fenólicos do material vegetal, os quais podem ser responsáveis pelas atividades farmacológicas relatadas na literatura, diferentes solventes foram avaliados utilizando-se um planejamento experimental do tipo centroide simplex. A superfície de resposta, construída com o modelo quadrático, indicou o uso de metanol puro ou a mistura etanol-água como os melhores solventes para extração de compostos fenólicos das brácteas. Já para as flores, a superfície de resposta, construída com o modelo especial cúbico, também indicou a mistura etanol-água como o melhor solvente.

Em relação à caracterização química, foram identificados por CLAE-DAD-EM 15 compostos a partir dos extratos utilizados no tratamento dos animais, sendo esses os extratos aquosos das brácteas e das flores, bem como os mesmos extratos após remoção dos açúcares por Amberlite XAD-2. O procedimento de remoção dos açúcares dos extratos mostrou ser eficiente. Dentre os compostos identificados, destacam-se os fenilpropanoides derivados do ácido *p*-cumárico (ácidos di-*O*-hexosil cumárico acetilados), ácido cafeico (ácido tretra-*O*-acetil di-*O*-hexosil cafeico) e ácido ferúlico (ácido tretra-*O*-acetil di-*O*-hexosil *O*-metil cafeico), os quais foram relatados pela primeira vez nessa espécie, e o flavonol glicosilado *O*-hexosil-deoxihexosil quercetina. Durante as análises de comparação da composição química dos extratos preparados com diferentes solventes, os resultados sugerem que ocorra uma hidrólise mais acentuada do ácido penta-*O*-acetil di-*O*-hexosil cumárico quando utilizado água como solvente.

Em relação a atividade imunomoduladora dos extratos, no ensaio hemolítico da via clássica do sistema complemento, o extrato hidroetanólico apresentou melhor atividade comparado aos demais extratos, exibindo um valor de ICH_{50} de $162,11 \pm 22,18 \mu\text{g/mL}$. Comparando-se os valores obtidos de ICH_{50} dos extratos hidroetanólicos e aquoso, conclui-se que os melhores resultados foram obtidos para os extratos hidroetanólicos, sugerindo que a maior concentração de compostos fenólicos totais e a presença do ácido penta-*O*-acetil di-*O*-hexosil cumárico esteja relacionada com a atividade imunomodulatória da via clássica. Já nos ensaios da via alternativa do sistema complemento, os extratos não apresentaram atividade inibitória significativa, além de não mostrarem efeito dose-dependente.

No ensaio de avaliação dos extratos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, os tratamentos com a fração metanólica da flor e com o extrato

aquoso da bráctea promoveram alterações estatisticamente significativas no perfil glicêmico pós-sobrecarga em relação ao grupo não tratado (diabético). Apesar do perfil glicêmico do grupo diabético tratado com extrato aquoso da flor não ter apresentado diferença estatística significativa quando comparado ao grupo diabético, é importante destacar que até 60 minutos após a sobrecarga de glicose o perfil é muito semelhante ao dos grupos tratados com insulina, indicando o potencial desse extrato. Adicionalmente, todos os extratos mostraram reduzir a glicemia de jejum. A partir desses resultados pode-se inferir que o potencial antidiabético da bráctea pode ser atribuído a uma ação sinérgica dos componentes totais do extrato e que, para os extratos das flores, a atividade pode estar relacionada a concentração dos ácidos fenilpropionícos hexosídeos.

Além disso, os extratos aquosos e frações mostraram uma redução nas alterações histológicas hepáticas e renais dos animais diabéticos induzidos com STZ, sendo que, para alguns parâmetros, apresentaram melhor preservação dos tecidos quando comparado até mesmo ao grupo tratado com insulina, sugerindo um efeito adicional ao controle glicêmico, como a atividade antioxidante dos extratos e frações.

Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para a investigação dos efeitos farmacológicos atribuídos a *M. x paradisiaca*, incluindo novos achados como os compostos identificados ainda não relatados na literatura para essa espécie assim como a demonstração do potencial imunomodulatório e antidiabético das brácteas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Editora Ltda, 2012. 592 ISBN 978-85-352-4744-2.
- ABBAS, K. et al. Pharmacognostic evaluation of *Musa paradisiaca* L. bract, flower, trachea and tracheal fluid. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 1461-1475, 2015.
- ABDALLAH, O. M.; KAMEL, M. S.; MOHAMED, M. H. Phenylpropanoid glycosides of *Prunus ssiori*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1689-1692, 1994.
- ABDURRAZAK, M. et al. In-vitro alpha-glucosidase inhibitory potential of extracts from *Musa paradisiaca*. **International Journal of Integrative Biology**, v. 16, n. 1, 2015.
- ABOU-ELELLA, F.; MOURAD, R. Anticancer and Anti-oxidant Potentials of Ethanolic Extracts of *Phoenix dactylifera*, *Musa acuminata* and *Cucurbita maxima*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 710-720, 2015.
- ADA. Standards of medical care in diabetes-2015: summary of revisions. **Diabetes Care**, v. 38 Suppl, p. S4, 2015.
- ADEWOYE, E. O.; IGE, A. O. Anti-diabetic property of methanol extract of *Musa sapientum* leaves and its fractions in alloxan-induced diabetic rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 91-7, 2013.
- ADEWOYE, E. O.; TAIWO, V. O.; OLAYIOYE, F. A. Anti-oxidant and anti-hyperglycemic activities of *Musa sapientum* root extracts in alloxan-induced diabetic rats. **African Journal of Medicine and Medical Sciences** v. 38, n. 2, p. 109-17, 2009.
- AGUILARA, F. J. A. et al. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 101-110, 1998.
- AHMAD, M.; AFLAB, K. Hypotensive action of syringin from *Syringa vulgaris*. **Phytotherapy research**, v. 9, p. 452-454, 1995.
- AHMAD, S. F. et al. Naringin attenuates the development of carrageenan-induced acute lung inflammation through inhibition of NF-kappaB, STAT3 and pro-inflammatory mediators and enhancement of IkappaBalpha and anti-inflammatory cytokines. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 846-57, 2015.
- ALIM, Z. et al. Inhibition behaviours of some phenolic acids on rat kidney aldose reductase enzyme: An in vitro study. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 277-284, 2017.

ALTABAS, V. Diabetes, endothelial dysfunction, and vascular repair: What should a diabetologist keep his eye on? **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 14, 2015.

AMALAN, V. et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of p-coumaric acid in diabetic rats, role of pancreatic GLUT 2: In vivo approach. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 230-236, 2016.

ANOSA, G. N.; OKORO, O. J. Anticoccidial activity of the methanolic extract of *Musa paradisiaca* root in chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 1, p. 245-8, 2011.

ARGENT, G. The wild bananas of Papua New Guinea. **Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh**, v. 35, n. 1, p. 77-114, 1976.

ARUN, K. B. et al. Dietary fibre and phenolic-rich extracts from *Musa paradisiaca* inflorescence ameliorates type 2 diabetes and associated cardiovascular risks. **Journal of Functional Foods**, v. 31, p. 198-207, 2017.

BAGAVAN, A.; RAHUMAN, A. A. Evaluation of larvicidal activity of medicinal plant extracts against three mosquito vectors. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 1, p. 29-34, 2011.

BAGAVAN, A. et al. In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v. 108, n. 1, p. 15-22, 2011.

BHASKAR, J. J. et al. Banana (*Musa* sp. var. elakki bale) flower and pseudostem: dietary fiber and associated antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 427-32, 2012.

BHASKAR, J. J.; SALIMATH, P. V.; NANDINI, C. D. Stimulation of glucose uptake by *Musa* sp. (cv. elakki bale) flower and pseudostem extracts in Ehrlich ascites tumor cells. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 8, p. 1482-7, 2011.

BILAL, H. M. et al. Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. **Cogent Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1275415, 2016.

BOONKIRD, S.; PHISALAPHONG, C.; PHISALAPHONG, M. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1075-1079, 2008.

BORAH, M.; DAS, S. Antidiabetic, antihyperlipidemic, and antioxidant activities of *Musa balbisiana* Colla. in Type 1 diabetic rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 71-76, 2017.

BOVO, F. et al. **Used of *Musa paradisiaca* flower extract as antiasthmatic and antiinflammatory for treating acute and chronic asthma, and used in chemistry, pharmacology, dermatology, cosmetology, medicine, homeopathic and veterinary**: Universidade Federal do Paraná 2014.

BOVO, F. et al. Modulating Effects of Arabinogalactans from Plant Gum Exudates on Human Complement System. **Scand J Immunol**, v. 83, n. 5, p. 314-20, 2016.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)**, v. 13, p. 1-45, 1951.

BROWN, N. J.; GREENBURGH, A.; TOMLIN, J. The effects of pectin and wheat bran on the distribution of a meal in the gastrointestinal tract of the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 72, n. 02, p. 289-297, 2007.

CALZADA, F. et al. Antihyperglycemic activity of the leaves from *Annona cherimola* Miller and rutin on alloxan-induced diabetic rats. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2017.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. D. B.; MANSO, P. P. D. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. G., et al (Ed.). **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, v.2, 2010. cap. 3, p.290. ISBN 978-85-98768-41-0.

CARROLL, M. C. Complement and Humoral Immunity. **Vaccine**, v. 26, n. 08, p. 128-133, 2008.

CASTELLANO, G. et al. Complement activation during ischemia/reperfusion injury induces pericyte-to-myofibroblast transdifferentiation regulating peritubular capillary lumen reduction through pERK signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1002, 2018.

CHANG, W. C. et al. Protective effect of vanillic acid against hyperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia via alleviating hepatic insulin resistance and inflammation in high-fat diet (HFD)-fed rats. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 9946-59, 2015.

CHATZIGEORGIOU, A. et al. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. **In Vivo**, v. 23, n. 2, p. 245-258, 2009.

CHEESMAN, E. Classification of the bananas: The genus *ensete* horan. **Kew bulletin**, p. 97-106, 1947a.

CHEESMAN, E. Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L. **Kew Bulletin**, p. 106-117, 1947b.

CHEN, I. H. et al. Anti-inflammatory triterpenoids from the stems of *Microtropis fokienensis*. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4608-23, 2014.

CHINA, R. et al. In vitro antioxidant activity of different cultivars of banana flower (*Musa paradiscus* L.) extracts available in India. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. C1292-C1299, 2011.

CHO, J. Y. et al. In-vitro and in-vivo immunomodulatory effects of syringin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 9, p. 1287-94, 2001.

CHOI, J. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of sinapyl alcohol and its glucoside syringin. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1027-32, 2004.

COHN, J. S. et al. Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. **Nutrients**, v. 2, n. 2, p. 116-27, 2010.

CORREA, M. et al. Bioactivity of extracts of *Musa paradisiaca* L. obtained with compressed propane and supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 63-69, 2017.

CORREA, M. et al. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 128-135, 2016.

COULTHARD, L. G.; WOODRUFF, T. M. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 8, p. 3542-3548, 2015.

DAUDE, D.; REMAUD-SIMEON, M.; ANDRE, I. Sucrose analogs: an attractive (bio)source for glycodiversification. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 9, p. 945-60, 2012.

DEY, P. et al. Assessment of anti-diabetic activity of an ethnopharmacological plant *Nerium oleander* through alloxan induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology** v. 161, p. 128-37, 2015.

DHAMI, N. Trends in pharmacognosy: A modern science of natural medicines. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 4, p. 123-131, 2013.

DHANABAL, S. P. et al. Hypoglycemic effect of ethanolic extract of *Musa sapientum* on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential. **Journal Of Herbal Pharmacotherapy**, v. 5, n. 2, p. 7-19, 2005.

DIAZ LANZA, A. M. et al. Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Phillyrea latifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity. **Planta Medica**, v. 67, n. 3, p. 219-23, 2001.

DIKEMAN, C. L.; MURPHY, M. R.; FAHEY JR., G. C. Dietary fibers affect viscosity of solutions and simulated human gastric and small intestinal digesta. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 913–919, 2006.

DIKSHIT, P. et al. Hepatoprotective effect of stem of *Musa sapientum* Linn in rats intoxicated with carbon tetrachloride. **Annals of Hepatology**, v. 10, n. 3, p. 333-9, 2011.

DINESHKUMAR, B.; ANALAVA, M.; MANJUNATHA, M. Antidiabetic and hypolipidaemic effects of few common plants extract in Type 2 diabetic patients at Bengal. **Int J Diabetes & Metab**, v. 18, p. 59-65, 2010.

DINESHKUMAR, B.; MITRA, A.; MANJUNATHA, M. A comparative study of alpha amylase inhibitory activities of common anti-diabetic plants at Kharagpur 1 block. **Int J Green Pharm**, v. 4, n. 2, p. 115-121, 2010.

DIVYA R. S., V. P., VADIVEL V.2, BRINDHA P. In vitro studies on the biological activities of flowers of banana (*Musa Paradisiaca* L.). **Scholars Research Library**, v. 8, n. 10, p. 238-246, 2016.

DOLEŽEL, J.; BARTOŠ, J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. **Annals of Botany**, v. 95, n. 1, p. 99-110, 2005.

EDENS, R. E. et al. Heparin and derivatized heparin inhibit zymosan and cobra venom factor activation of complement in serum. **Immunopharmacology**, v. 27, n. 2, p. 145-53, 1994.

EDEOGA, H. O.; OKWU, D. E.; MBAEBIE, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

ELEAZU, C. O. et al. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, n. 1, p. 60, 2013.

FAKHRUDIN, N. et al. Computer-aided discovery, validation, and mechanistic characterization of novel neolignan activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Molecular Pharmacology**, v. 77, n. 4, p. 559-66, 2010.

FAN, P. et al. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F.Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). **Fitoterapia**, v. 81, n. 2, p. 124-131, 2010.

FAO. Banana market review 2013-2014. **Food an Agricultural Organization of the United States**. 2015.

FAO. **Banana facts and figures**: Food an Agricultural Organization of the United States 2018.

FATTAHI, F. et al. Role of complement C5a and histones in septic cardiomyopathy. **Molecular Immunology**, 2018.

FERREIRA, J. P. R. **Musaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2018.

FINDLAY, J. W. A.; DILLARD, R. F. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. **The AAPS Journal**, v. 9, n. 2, p. E260-E267, 2007.

- FINGOLO, C. E. et al. The natural impact of banana inflorescences (*Musa acuminata*) on human nutrition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 891-898, 2012.
- FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784-90, 2014.
- FUJIMOTO, K. et al. Structures of acylated sucroses from the flower buds of *Prunus mume*. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, n. 3, p. 481-7, 2014.
- FURMAN, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 70, p. 5.47.1-5.47.20, 2015.
- GANUGAPATI, J.; BALDWA, A.; LALANI, S. Molecular docking studies of banana flower flavonoids as insulin receptor tyrosine kinase activators as a cure for diabetes mellitus. **Bioinformation**, v. 8, n. 5, p. 216-220, 2012.
- GONG, X. et al. Hepatoprotective effects of syringin on fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 265-71, 2014.
- GONZALES, G. F.; GONZALES-CASTANEDA, C.; GASCO, M. A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 23, n. 7, p. 509-18, 2013.
- GUO, H.; LING, W. The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: experimental evidence and clinical perspectives. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2015.
- GUO, R. F.; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annual Review of Immunology** v. 23, p. 821-52, 2005.
- GUTIERRES, V. O. et al. Curcumin pharmacokinetic and pharmacodynamic evidences in streptozotocin-diabetic rats support the antidiabetic activity to be via metabolite(s). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 678218, 2015.
- HAIDER, S. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of two new triterpenoids from *Adiantum capillus-veneris* Linn. **Natural Product Research**, v. 27, n. 24, p. 2304-10, 2013.
- HÄKKINEN, M. Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (Musaceae). **Taxon**, v. 62, n. 4, p. 809-813, 2013.
- HANDELSMAN, Y. et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology - clinical practice guidelines for developing a diabetes mellitus comprehensive care plan - 2015. **Endocrine Practice**, v. 21 Suppl 1, p. 1-87, 2015.

HARWOOD, H. J. J. et al. Pharmacologic consequences of cholesterol absorption inhibition: Alteration in cholesterol metabolism and reduction in plasma cholesterol concentration induced by the synthetic saponin B-tigogenin cellobioside (CP-88818; tiqueside). **The Journal of Lipid Research**, v. 34, p. 377-395, 1993.

HESLOP-HARRISON, J. S.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1073-84, 2007.

HIGGINS, J. P. T.; GREEN, S. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0** The Cochrane Collaboration 2011.

HO, C. S. et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3-12, 2003.

HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology** v. 14, p. 43, 2014.

HUANG, E. S. et al. Rates of complications and mortality in older patients with diabetes mellitus: the diabetes and aging study. **JAMA Internal Medicine** v. 174, n. 2, p. 251-8, 2014.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 25 2013.

IBGE. Anuário Estatístico do Brasil 2014. 74 2014a.

IBGE. Produção da extração vegetal e da silvicultura 1990-2014. In: Sidra: sistema IBGE de recuperação automática. Rio de Janeiro, 2014b.

IDF. International Diabetes Federation Diabetes Atlas 7th edition. 2015.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. Anti-diabetic potential of *Sapium ellipticum* (Hochst) Pax leaf extract in Streptozotocin(STZ)-induced diabetic Wistar rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 525, 2017.

IMAM, M. Z.; AKTER, S. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L. : A phytochemical and pharmacological review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 14-20, 2011.

JAWLA, S.; KUMAR, Y.; KHAN, M. S. Y. Antimicrobial and antihyperglycemic activities of *Musa paradisiaca* flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, Supplement, p. S914-S918, 2012.

JENTZER, J. B. et al. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**, v. 166, p. 561-7, 2015.

JO, S.-H. et al. Comparison of antioxidant potential and rat intestinal alpha-glucosidases inhibitory activities of quercetin, rutin, and isoquercetin. **2009**, v. 2, n. 4, p. 9, 2009.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw Hill Book Company Inc New York And London, 1940. 503.

K, B. A. et al. *Musa paradisiaca* inflorescence induces human colon cancer cell death by modulating cascades of transcriptional events. **Food & Function**, v. 9, n. 1, p. 511-524, 2018.

KANDASAMY, S.; RAMU, S.; ARADHYA, S. M. In vitro functional properties of crude extracts and isolated compounds from banana pseudostem and rhizome. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 96, n. 4, p. 1347-55, 2016.

KARUPPIAH, P.; MUSTAFFA, M. Antibacterial and antioxidant activities of *Musa* sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 9, p. 737-42, 2013.

KAWAI, Y. et al. β -Glucosidase inhibitory activities of phenylpropanoid glycosides, vanicoside A and B from *Polygonum sachalinense* rhizome. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 456-459, 2006.

KHONGKHON, S.; RUANGNOO, S.; ITHARAT, A. Inhibition of LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cell lines, DPPH radical scavenging and total phenolic content of banana (*Musa sapientum*) blossom extracts. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 100, n. 5, p. S67-S73, 2017.

KIANG, Y.; REID, D. L.; JONA, J. Formulation development for preclinical in vivo studies. In: ZHANG, D. e SURAPANENI, S. (Ed.). **ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012. p.473-483. ISBN 9780470542781.

KIEM, P. V. et al. New phenylpropanoid esters of sucrose from *Polygonum hydropiper* and their antioxidant activity. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 11, p. 1477-82, 2008.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical Reviews**, v. 2, n. 1-4, p. 23-60, 2010.

KING, A.; BOWE, J. Animal models for diabetes: Understanding the pathogenesis and finding new treatments. **Biochemical Pharmacology**, v. 99, p. 1-10, 2016.

KIRCHHOOF, B. K. Ovary structure and anatomy in the Heliconiaceae and Musaceae (Zingiberales). **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 2490-2508, 1992.

KITDAMRONGSONT, K. et al. Anthocyanin composition of wild bananas in Thailand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10853-7, 2008.

KUMAR, B. R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 6, p. 349-364, 2017.

KUMAR, K. P. S. et al. Traditional and medicinal uses of banana **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 3, p. 51-63, 2012.

LAUMONNIER, Y. et al. Regulation and function of anaphylatoxins and their receptors in allergic asthma. **Molecular Immunology**, v. 84, p. 51-56, 2017.

LEE, K. H. et al. Evaluation of anti-inflammatory, antioxidant and antinociceptive activities of six Malaysian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 23, p. 5555-5563, 2011.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-26, 2008.

LI, H.; YAO, Y.; LI, L. Coumarins as potential antidiabetic agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 10, p. 1253-1264, 2017.

LI, L. et al. Review on complement analysis method and the roles of glycosaminoglycans in the complement system. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 590-597, 2015.

LI, W. et al. Application of response surface methodology to optimise ultrasonic-assisted extraction of four chromones in *Radix Saposhnikovia*. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 4, p. 313-21, 2011.

LIBERATI, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **British Medical Journal**, v. 339, p. b2700, 2009.

LIU, R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 3, p. 517S-520S, 2003.

LIU, Y.; WANG, M.-W. Botanical drugs: challenges and opportunities: contribution to Linnaeus memorial symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, n. 9-10, p. 445-449, 2008.

LIU, Z. et al. Prevalence of chronic complications of type 2 diabetes mellitus in outpatients - a cross-sectional hospital based survey in urban China. **Health Qual Life Outcomes**, v. 8, p. 62, 2010.

LOZA-MEJIA, M. A.; SALAZAR, J. R. Sterols and triterpenoids as potential anti-inflammatories: Molecular docking studies for binding to some enzymes involved in inflammatory pathways. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 62, p. 18-25, 2015.

MAHMOOD, A.; NGAH, N.; OMAR, M. N. Phytochemicals constituent and antioxidant activities in *Musa x paradisiaca* flower. **European Journal of Scientific Research**, v. 66, n. 2, p. 311-318, 2011.

MAHMOOD, A.; OMAR, M. N.; NGAH, N. Galactagogue effects of *Musa x paradisiaca* flower extract on lactating rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 11, p. 882-886, 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

MARIKKAR, J. M. N. et al. Evaluation of banana (*Musa* sp.) flowers of selected varieties for their antioxidative and anti-hyperglycemic potentials. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 5, p. 1988-1995, 2016.

MARTIN, T. S. et al. A hemiterpenoid glucoside from *Musa paradisiaca*. **Journal of Natural Medicines**, v. 54, n. 4, p. 190-192, 2000.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141.

MATSUI, T. et al. Anti-hyperglycemic potential of natural products. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 349-56, 2006.

MAZO, V. K. et al. [Genetic rat models of type 2 diabetes for evaluation the effectiveness of minor biologically active food substances]. **Voprosy pitaniia**, v. 83, n. 6, p. 25-31, 2014.

MELO, I. C. A. R. D. **Separação preparativa de constituintes químicos de *Erythrina velutina* Willd. através do uso de amberlite® XAD2 e cromatografia líquida de alta eficiência preparativa**. - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

MERLE, N. S. et al. Complement system part I – Molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 262, 2015.

MORAES, M. L. et al. Optimization of chemometric approaches for the extraction of isorhamnetin-3-O-rutinoside from *Calendula officinalis* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 408-14, 2016.

NAKAMURA, S. et al. Structures of acylated sucroses and an acylated flavonol glycoside and inhibitory effects of constituents on aldose reductase from the flower buds of *Prunus mume*. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 799-806, 2013.

NAZARUK, J.; BORZYM-KLUCZYK, M. The role of triterpenes in the management of diabetes mellitus and its complications. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 4, p. 675-690, 2015.

NEERVANNAN, S. Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 2, n. 5, p. 715-31, 2006.

NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Unicamp, 2001. 301-344.

NGAMUKOTE, S. et al. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5054-61, 2011.

NIRMALA, M. et al. Hepatoprotective activity of *Musa paradisiaca* on experimental animal models. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 11-5, 2012.

NISHA, P.; MINI, S. Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescence down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1838-1847, 2013a.

NISHA, P.; MINI, S. Flavanoid rich ethyl acetate fraction of *Musa paradisiaca* inflorescence down-regulates the streptozotocin induced oxidative stress, hyperglycaemia and mRNA levels of selected inflammatory genes in rats. **J Funct Foods**, v. 5, n. 4, p. 1838-1847, 2013b.

NISHA, P.; MINI, S. In vitro antioxidant and antiglycation properties of methanol extract and its different solvent fractions of *Musa paradisiaca* L. (Cv. Nendran) inflorescence. **International Journal of Food Properties**, v. 17, n. 2, p. 399-409, 2014.

NIU, H. S. et al. Hypoglycemic effect of syringin from *Eleutherococcus senticosus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 74, n. 2, p. 109-13, 2008.

NOGUEIRA, F. A. et al. Anthelmintic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo tests. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 317-23, 2012.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MC CULL, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. protoplasma. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OSUJI, J. O. Microstructural Characters of the Inflorescence Bracts Discriminate Between *Musa sapientum* L. and *M. paradisiaca* L. **International Journal of Botany**, v. 2, n. 1, p. 11-16, 2006.

PALMA, H. E. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 386, n. 1-2, p. 199-210, 2014.

PANDA, P.; APPALASHETTI, M.; JUDEH, Z. M. Phenylpropanoid sucrose esters: plant-derived natural products as potential leads for new therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 3234-51, 2011.

PANDEY, M. M. et al. Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. **Journal of Integrative Medicine**, v. 14, n. 6, p. 447-455, 2016.

PANG, B. et al. The applications and features of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of traditional chinese medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 7, 2016.

PARHIZ, H. et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 3, p. 323-31, 2015.

PASSARI, L. M.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Analytica Chimica Acta**, v. 821, p. 89-96, 2014.

PEREIRA, A.; MARASCHIN, M. Banana (*Musa* spp) from peel to pulp: Ethnopharmacology, source of bioactive compounds and its relevance for human health. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 149-163, 2015.

PERRIER, X. et al. Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 108, n. 28, p. 11311-8, 2011.

PHUAKLEE, P.; RUANGNOO, S.; ITHARAT, A. Anti-inflammatory and antioxidant activities of extracts from *Musa sapientum* peel. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 95 Suppl 1, p. S142-6, 2012.

PRAGASAM, S. J.; VENKATESAN, V.; RASOOL, M. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. **Inflammation**, v. 36, n. 1, p. 169-76, 2013.

QUILEZ, A.; GARCIA, M. D.; SÁENZ, M. T. Plantas utilizadas en procesos inflamatorios y cancerosos en el área del Caribe. **Revista de Fitoterapia**, v. 6, n. 1, p. 59-63, 2006.

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, n. Supplement C, p. 13-31, 2016.

RAMU, R. et al. Correction: Assessment of In Vivo Antidiabetic Properties of Umbelliferone and Lupeol Constituents of Banana (*Musa* sp. var. Nanjangud Rasa Bale) Flower in Hyperglycaemic Rodent Model. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0160048, 2016.

RAMU, R. et al. Evaluation of banana (*musa* sp. var. nanjangud rasa bale) flower and pseudostem extracts on antimicrobial, cytotoxicity and thrombolytic activities. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, 2015.

RAMU, R. et al. Investigation of antihyperglycaemic activity of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) pseudostem in normal and diabetic rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 165-73, 2015.

RAMU, R. et al. Inhibitory effect of banana (*Musa* sp. var. Nanjangud rasa bale) flower extract and its constituents Umbelliferone and Lupeol on α -glucosidase, aldose reductase and glycation at multiple stages. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 54-63, 2014.

RAO, U. S. M. In vitro nitric oxide scavenging and anti inflammatory activities of different solvent extracts of various parts of *Musa paradisiaca*. **Malaysian Journal of Analytical Science**, v. 20, n. 5, p. 1191-1202, 2016.

REDDY, A. J. et al. Anticonvulsant and Antioxidant Effects of *Musa sapientum* Stem Extract on Acute and Chronic Experimental Models of Epilepsy. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 1, p. 49-54, 2018.

REN, B. et al. Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. **European Journal of Pharmacology** v. 773, p. 13-23, 2016.

SAGOT, M. Sur le genre bananier. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 34, n. 7, p. 328-330, 1887.

SARKAR, P. et al. Traditional and ayurvedic foods of Indian origin. **Journal of Ethnic Foods**, v. 2, n. 3, p. 97-109, 2015.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.

SCHEFFÉ, H. Experiments with mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 20, n. 2, p. 344-360, 1958.

SENS, S. L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos xokleng da terra indígena Ibirama**. 365. - Mestrado em Engenharia da Produção, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis 2002.

SHARMA, M. et al. Emerging potential of citrus flavanones as an antioxidant in diabetes and its complications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 187-95, 2015.

SHENG, Z. et al. Isolation and characterization of an alpha-glucosidase inhibitor from *Musa* spp. (Baxijiao) flowers. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10563-73, 2014.

SHEORAN, S. et al. Ultrasound-assisted extraction of gymnemic acids from *Gymnema sylvestre* leaves and its effect on insulin-producing RINm-5 F beta cell lines. **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 2, p. 97-104, 2015.

SHIROTA, O.; SEKITA, S.; SATAKE, M. Two phenylpropanoid glycosides from *Sparganium stoloniferum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 4, p. 695-698, 1997.

SIMMONDS, N.; WEATHERUP, S. Numerical taxonomy of the wild bananas (Musa). **New Phytologist**, v. 115, n. 3, p. 567-571, 1990.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 55, n. 359, p. 302-312, 1955.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SINGH, D. K.; WINOCOUR, P.; FARRINGTON, K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, n. 3, p. 176-84, 2011.

SINGH, M. P.; PATHAK, K. Animal models for biological screening of anti-diabetic drugs: An overview. **European Journal of Experimental Biology**, v. 5, n. 5, p. 37-48, 2015.

SOHRETOGLU, D. et al. Potential of *Potentilla inclinata* and its polyphenolic compounds in alpha-glucosidase inhibition: Kinetics and interaction mechanism merged with docking simulations. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 108, p. 81-87, 2018.

STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 744-57, 2011.

SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, S.; PILLAI SUBRAMANIAN, I.; PILLAI SUBRAMANIAN, S. Isolation, characterization of syringin, phenylpropanoid glycoside from *Musa paradisiaca* tepal extract and evaluation of its antidiabetic effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 105-111, 2014a.

SUNDARAM CHINNA KRISHNAN, S.; PILLAI SUBRAMANIAN, I.; PILLAI SUBRAMANIAN, S. Isolation, characterization of syringin, phenylpropanoid glycoside from *Musa paradisiaca* tepal extract and evaluation of its antidiabetic effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomed Prev Nutr**, v. 4, n. 2, p. 105-111, 2014b.

SUNDARAM, S. C.; SUBRAMANIAN, S. *Musa paradisiaca* flower extract improves carbohydrate metabolism in hepatic tissues of streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1498-S1503, 2012a.

SUNDARAM, S. C.; SUBRAMANIAN, S. Musa Paradisiaca flower extract improves carbohydrate metabolism in hepatic tissues of streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 2, n. 3, p. S1498-S1503, 2012b.

SWATHI, D.; JYOTHI, B.; SRAVANTHI, C. A review: Pharmacognostic studies and pharmacological actions of *Musa Paradisiaca*. **International Journal of Innovative Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 2, p. 122-125, 2011.

TIMSINA, B.; NADUMANE, V. K. Anti-cancer potential of banana flower extract: An in vitro study. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 628-635, 2014.

TIN, H. S. et al. Isolation and structure elucidation of triterpenes from inflorescence of banana (*Musa balbisiana* cv. Saba). **International Food Research Journal** v. 23, n. 2, p. 866-872, 2016.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 315-331, 2010.

VINATORU, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 3, p. 303-313, 2001.

WAGNER, E.; FRANK, M. M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 43, 2009.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 14, p. 1058-66, 2001.

WANG, K.-J.; ZHANG, Y.-J.; YANG, C.-R. Antioxidant phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 259-264, 2005.

WANG, N. et al. Bioactive sucrose esters from *Bidens parviflora*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 5, p. 741-6, 2003.

WANG, P.-S.; FANG, J.-J. The optimization of medicine formulation using mixture experiments. In: AO, S. I.; CASTILLO, O., et al (Ed.). **Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists 2010**: Newswood Limited, v.III, 2010.

WANG, R. et al. The role of C5a in acute lung injury induced by highly pathogenic viral infections. **Emerging Microbes & Infections** v. 4, n. 5, p. e28, 2015.

WHITE, P. A. et al. Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339-45, 2013.

WHITE, P. R. **Studies on the banana : an investigation of the floral morphology and cytology of certain types of the genus Musa L.** Berlin Springer, 1928. 60.

WU, H. et al. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, p. 267-291, 2013.

YAKUBU, M. T. et al. Effects of aqueous extract of *Musa paradisiaca* root on testicular function parameters of male rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology** v. 24, n. 2, p. 151-7, 2013.

YANG, H. L. et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 1, p. 522-32, 2012.

YAZGAN, U. C. et al. Comparison of the anti-diabetic effects of resveratrol, gliclazide and losartan in streptozotocin-induced experimental diabetes. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 121, n. 4, p. 157-61, 2015.

YOSHIKAWA, M. et al. New flavonol oligoglycosides and polyacylated sucroses with inhibitory effects on aldose reductase and platelet aggregation from the flowers of *Prunus mume*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1151-5, 2002.

ZENG, Q.-H. et al. Antioxidant and anticomplement functions of flavonoids extracted from *Penthorum chinense* Pursh. **Food & Function**, v. 4, n. 12, p. 1811-1818, 2013.

ZHANG, A. et al. Protective effects of syringin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Journal of Surgical Research**, v. 209, p. 252-257, 2017.

ZHANG, X. et al. An on-line high-performance liquid chromatography-diode-array detector-electrospray ionization-ion-trap-time-of-flight-mass spectrometry-total antioxidant capacity detection system applying two antioxidant methods for activity evaluation of the edible flowers from *Prunus mume*. **Journal of Chromatography A**, v. 1414, p. 88-102, 2015.

ZHENG, H.-C.; LU, Y.; CHEN, D.-F. Anticomplement compounds from *Polygonum chinense*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 9, p. 1495-1500, 2018.

APÊNDICE 1 – ESTRATÉGIA DE BUSCA COMPLETA REALIZADA NO PUBMED

PubMed	#1 "pharmaceutical properties"[Title/Abstract] OR "pharmaceutical property"[Title/Abstract]) OR "pharmacological effect"[Title/Abstract]) OR "biological activity"[Title/Abstract]) OR "biological activities"[Title/Abstract]) OR "biological activity"[Title/Abstract]) OR antibacterial[Title/Abstract]) OR anti-bacterial[Title/Abstract]) OR "anti bacterial"[Title/Abstract]) OR antiviral[Title/Abstract]) OR anti-viral[Title/Abstract]) OR "anti viral"[Title/Abstract]) OR antifungal[Title/Abstract]) OR anti-fungal[Title/Abstract]) OR "anti fungal"[Title/Abstract]) OR antihelmintic[Title/Abstract]) OR anti-helmintic[Title/Abstract]) OR "anti helmintic"[Title/Abstract]) OR antiparasitic[Title/Abstract]) OR anti-parasitic[Title/Abstract]) OR "anti parasitic"[Title/Abstract]) OR antioxidant[Title/Abstract]) OR anti-oxidant[Title/Abstract]) OR "anti oxidant"[Title/Abstract]) OR antitumoral[Title/Abstract]) OR anti-tumoral[Title/Abstract]) OR antitumour[Title/Abstract]) OR anti-tumour[Title/Abstract]) OR "anti tumour"[Title/Abstract]) OR "anti tumoral"[Title/Abstract]) OR anticancer[Title/Abstract]) OR anti-cancer[Title/Abstract]) OR "anti cancer"[Title/Abstract]) OR antiproliferative[Title/Abstract]) OR anti-proliferative[Title/Abstract]) OR "anti proliferative"[Title/Abstract]) OR antiasthmatic[Title/Abstract]) OR anti-asthmatic[Title/Abstract]) OR "anti asthmatic"[Title/Abstract]) OR asthma[Title/Abstract]) OR antiinflammation[Title/Abstract]) OR anti-inflammation[Title/Abstract]) OR "anti inflammation"[Title/Abstract]) OR inflammation[Title/Abstract]) OR "raw 264"[Title/Abstract]) OR antinociceptive[Title/Abstract]) OR anti-nociceptive[Title/Abstract]) OR "anti nociceptive"[Title/Abstract]) OR analgesic[Title/Abstract]) OR "anti hyperglycemic"[Title/Abstract]) OR anti-hyperglycemic[Title/Abstract]) OR antihyperglycemic[Title/Abstract]) OR hypoglycemic[Title/Abstract]) OR hypoglycaemic[Title/Abstract]) OR antihypertensive[Title/Abstract]) OR anti-hypertensive[Title/Abstract]) OR "anti hypertensive"[Title/Abstract]) OR antihyperlipidemic[Title/Abstract]) OR anti-hyperlipidemic[Title/Abstract]) OR "anti hyperlipidemic"[Title/Abstract]) OR hypolipidemic[Title/Abstract]) OR hypolipidaemic[Title/Abstract]) OR larvicidal[Title/Abstract]) OR antiobesity[Title/Abstract]) OR anti-obesity[Title/Abstract]) OR "anti obesity"[Title/Abstract]) OR
---------------	---

	antidiarrheal[Title/Abstract]) OR anti-diarrheal[Title/Abstract]) OR "anti diarrheal"[Title/Abstract]) OR cardioprotective[Title/Abstract]) OR hepatoprotective[Title/Abstract]) OR hepatotoxicity[Title/Abstract]) OR cytotoxic[Title/Abstract] OR "antioxidants"[MeSH Terms] OR "inflammation"[MeSH Terms] #2 musa[Title/Abstract] OR "musa sp."[Title/Abstract]) OR "musa sapientum"[Title/Abstract]) OR "m. sapientum"[Title/Abstract]) OR "musa paradisiaca"[Title/Abstract]) OR "m. paradisiaca"[Title/Abstract]) OR "musa x paradisiaca"[Title/Abstract]) OR (banana[Title/Abstract] OR banana'[Title/Abstract] OR banana's[Title/Abstract] OR bananacide[Title/Abstract] OR bananal[Title/Abstract] OR bananalike[Title/Abstract] OR bananan[Title/Abstract] OR bananaquit[Title/Abstract] OR bananaquits[Title/Abstract] OR bananarama[Title/Abstract] OR bananaramasp[Title/Abstract] OR bananas[Title/Abstract] OR bananas'[Title/Abstract] OR bananashaped[Title/Abstract])) OR (plantain[Title/Abstract] OR plantain'[Title/Abstract] OR plantainoside[Title/Abstract] OR plantains[Title/Abstract])) OR aab[Title/Abstract]) OR mysore[Title/Abstract]) OR "french plantain"[Title/Abstract]) OR nendran[Title/Abstract]) OR prata[Title/Abstract]) OR "apple banana"[Title/Abstract] OR "musa"[MeSH Terms] #1 AND #2
--	--

Fonte: O autor (2018).

APÊNDICE 2 – JUSTIFICATIVA DA EXCLUSÃO DE ESTUDOS APÓS LEITURA NA ÍNTEGRA

Estudo	Autor/ano	Justificativa de exclusão
1	Abou-Elella and	Parte da planta avaliada: casca e fruta
2	Pellegrini et al., 2003	Parte da planta avaliada: fruta
3	Ahamad et al., 2015	Não avaliou atividade biológica
4	Ali, Chanu, and Devi,	Não avaliou atividade biológica
5	Bagavan and	Atividade biológica: larvicida
6	Bagavan, Rahuman,	Atividade biológica: antimalárica
7	Bhaskar, Shobha,	Não preparou extrato
8	China et al., 2011	Não avaliou atividade biológica
9	Correa et al., 2017	Atividade biológica: antibacteriana e imunomoduladora
10	Divya,	Atividade biológica: anti-inflamatória e inibição de lipase
11	Ganugapati, Baldwa,	Avaliação de atividade <i>in silico</i>
12	Gogoi and Konwar,	Não avaliou atividade biológica
13	Gomathy,	Parte da planta avaliada: caule
14	Gomathy,	Parte da planta avaliada: caule
15	Jaber, Baydoun, EL-	Parte da planta avaliada: caule
16	Jamuna and Nandini,	Não preparou extrato
17	Jayamurthy, Aparna,	Parte da planta avaliada: caule
18	Kusirisin et al., 2009	Atividade biológica: prevenção do estresse oxidativo
19	Lee et al., 2011	Parte da planta avaliada: caule
20	Loganayaki,	Atividade biológica: anti-hemolítica
21	Mahmood, Ngah, and	Não avaliou atividade biológica
22	Marques et al., 2012	Atividade biológica: antimalárica
23	Martins et al., 2008	Atividade biológica: antiviral
24	Nogueira et al., 2012	Atividade biológica: anti-helmíntica
25	Padam, Chye, and	Atividade biológica: antibacteriana
26	Radhika, Jothi, and	Atividade biológica: antioxidante
27	Ramu et al., 2015	Atividade biológica: antimicrobiana, citotóxica e trombolítica
28	Rao, Ahmad, and	Atividade biológica: anti-inflamatória
29	Schmidt et al., 2015	Não avaliou atividade biológica
30	Sheng et al., 2011	Não avaliou atividade biológica
31	Singh et al., 2012	Não avaliou atividade biológica
32	Sumathy, Lachumy,	Atividade biológica: antimicrobiana
33	Tai et al., 2014	Não avaliou atividade biológica
34	Timsina and	Atividade biológica: anticancer
35	Tin et al., 2015	Atividade biológica: antibacteriana
36	Wan-Ibrahim, Sidik,	Atividade biológica: genotoxicidade

Fonte: O autor (2018).

ANEXO 1 – DEPÓSITO DA EXSICATA DE *M. x paradisiaca*

ANEXO 2 – PARECER DO PROJETO DE PROTOCOLO CEUA/FCF/CAr: 31/2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de efeito da administração de extrato de *Musa paradisiaca* e ácido p-cumárico em parâmetros fisiológicos e níveis glicêmicos em ratos diabéticos", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 31/2017, sob a responsabilidade da Professora Doutora Rosângela Gonçalves Peccinini, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em reunião de 21 de fevereiro de 2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro de 2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	56
Peso/Idade	150g/3 a 4 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UNESP/Botucatu

Araraquara, 21 de fevereiro de 2018.

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA