

EDUARDA DE MAGALHÃES DIAS FRINHANI

**EFEITO DE ANTOCIANINAS DE UVAS ROXAS (ENOCIANINAS) E DE
ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DE TRAPOERABA (*Tradescantia pallida*)
EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
JULHO - 1998

EDUARDA DE MAGALHÃES DIAS FRINHANI

**EFEITO DE ANTOCIANINAS DE UVAS ROXAS (ENOCIANINAS) E DE
ANTOCIANINAS EXTRAÍDAS DE TRAPOERABA (*Tradescantia pallida*)
EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Curso de Agroquímica,
para obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

APROVADA: 2 de abril de 1998.

Prof^a Tânia Toledo de Oliveira
(Conselheira)

Prof. José Humberto de Queiroz
(Conselheiro)

Prof. Tanus Jorge Nagem

Prof. Efraim Lázaro Reis

Prof^a Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Orientadora)

Aos meus pais, Aloísio e Alfa.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Química (DEQ), pela oportunidade de realização deste curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela oportunidade, pela orientação, pela disponibilidade, pelo apoio e pela amizade.

À Professora Tânia Toledo de Oliveira e aos professores Aloisio da Silva Pinto e Antônio Augusto Neves, pela disponibilidade e amizade.

Aos Professores José Humberto Queiroz, Tanus Jorge Nagem e Efraim Lázaro Reis, pela participação na banca de defesa de tese.

Aos técnicos dos laboratórios onde trabalhei, em especial à funcionária Dona Zezinha, do Departamento de Nutrição e Saúde.

Aos alunos de iniciação científica Luzia Valentina Modolo e André Luiz, pela grande ajuda no desenvolvimento dos trabalhos experimentais.

A todos os amigos e colegas de curso, pela troca de experiências, pelo apoio e pelo companheirismo.

Ao Marco Antonio, pelo apoio, carinho e auxílio indispensável no desenvolvimento dos experimentos, meu agradecimento especial.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio e companheirismo.

BIOGRAFIA

EDUARDA DE MAGALHÃES DIAS FRINHANI, filha de Aloísio Frinhani e Alfa Maria de Magalhães Dias Frinhani, nasceu em Timóteo, Estado de Minas Gerais, em 4 de fevereiro de 1972.

Em março de 1991 ingressou no curso de Química, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), graduando-se em julho de 1995.

No período de março de 1994 a julho de 1995 foi estudante de iniciação científica do Laboratório de Química Ambiental, do Departamento de Química da UFV.

Em agosto de 1995, iniciou o curso de Mestrado em Agroquímica, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em abril de 1998.

CONTEÚDO

EXTRATO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Antocianinas	3
2.2. Antocianinas de uvas	9
2.3. Antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i>	10
2.4. Extração e purificação de antocianinas	12
2.5. Toxicologia e propriedades farmacológicas de antocianinas	14
2.6. Tecido ósseo	17
2.6.1. O colágeno	18
2.6.2. Proteínas não-colagenosas	20
2.7. Diabetes melito e desordens no metabolismo	22
2.8. Mecanismo de ação do aloxano na indução do diabetes melito	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Extração e purificação de antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i>	29
3.1.1. Identificação botânica da espécie estudada	29
3.1.2. Escolha do sistema de extração de antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i>	30

3.1.3. Determinação do tempo de extração de antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i>	30
3.1.4. Preparação do extrato antociânico de <i>Tradescantia pallida</i>	31
3.1.5. Purificação do extrato antociânico de <i>Tradescantia pallida</i>	31
3.1.5.1. Cromatografia em coluna de polivinilpolipirrolidona	31
3.1.5.2. Cromatografia em coluna com celulose	31
3.2. Extratos antociânicos utilizados no ensaio biológico	32
3.2.1 Extrato antociânico de <i>Tradescantia pallida</i>	32
3.2.2. Determinação do peso seco do extrato antociânico	33
3.2.3. Extrato antociânico de uvas roxas	33
3.3. Avaliação do efeito de extratos antociânicos de <i>Tradescantia pallida</i> e de uvas roxas em ratos diabéticos	34
3.3.1. Indução do diabetes por injeção intravenosa de aloxano	35
3.3.2. Avaliação da glicemia sangüínea e ganho de peso corporal	36
3.4. Determinação de proteínas do tecido ósseo	37
3.4.1. Determinação de proteínas não-colagenosas pelo método de Bradford	37
3.4.2. Determinação de proteínas colagenosas pelo método de Berthelot	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Extração e purificação de antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i>	39
4.1.1. Escolha do sistema extrator de antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i> .	39
4.1.2. Determinação do tempo de extração de antocianinas de <i>Tradescantia pallida</i>	42
4.1.3. Purificação do extrato antociânico de <i>Tradescantia pallida</i>	43
4.2. Extrato antociânico de <i>Tradescantia pallida</i> utilizado no ensaio biológico	46
4.2.1. Determinação do peso seco	46
4.3. Indução do diabetes por injeção intravenosa de aloxano	47
4.4. Efeito das antocianinas no nível de glicose sangüínea	50
4.5. Efeito das antocianinas no peso corporal	57
4.6. Efeito de antocianinas nas proteínas colagenosas e não-colagenosas	65
4.6.1. Proteínas colagenosas	66
4.6.2. Proteínas não-colagenosas	70

5. RESUMO E CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICES	85

EXTRATO

FRINHANI, Eduarda de Magalhães Dias, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 1998. **Efeito de antocianinas de uvas roxas (enocianinas) e de antocianinas extraídas de trapoeraba (*Tradescantia pallida*) em ratos normais e diabéticos.** Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Conselheiros: Tânia Toledo de Oliveira e José Humberto de Queiroz.

Com o intuito de se avaliar o efeito de antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas em animais normais e diabéticos, foi realizado um modelo experimental com ratos albinos, da raça *Wistar*, que foram alimentados com ração comercial e uma dose diária de 50 mg do extrato antociânico. O experimento teve duração de 21 dias, em que se avaliaram o nível de glicose sangüínea e o peso corporal. O teor de proteínas colagenosas e não-colagenosas no tecido ósseo das patas dianteiras e traseiras dos animais foi avaliado no final do experimento. O diabetes foi induzido pela administração intravenosa de aloxano, perfazendo uma dose de 60 mg/kg de peso corporal. Esta patologia foi caracterizada pela elevação da glicose sangüínea, após quatro dias de aplicação do aloxano e também pelo aumento do nível de proteínas colagenosas no tecido ósseo das patas dos animais, após os 21 dias de tratamento. Um volume de 6 mL do extrato aquoso de antocianinas de *Tradescantia pallida*, equivalente a 50 mg

de peso seco, foi misturado, diariamente, à ração comercial. Antocianinas de *Tradescantia pallida* foram extraídas, com uma solução etanol:água (40:60) acidificada com HCl 0,1%, e parcialmente purificadas em uma coluna cromatográfica, que teve como fase estacionária a polivinilpolipirrolidona. O extrato antociânico de uvas roxas, na forma de pó, é utilizado comercialmente como corante alimentício, sendo conhecido como enocianina. Os resultados obtidos mostraram que antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas não tiveram efeito hipoglicemiante nos ratos diabéticos. Ratos normais e diabéticos tratados com antocianinas de uvas roxas e ratos normais tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentaram um ganho constante de peso corporal. Ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* perderam peso, apesar de terem consumido a mesma quantidade de alimento que os outros animais. Observou-se uma redução dos níveis de proteínas colagenosas do tecido ósseo das patas traseiras e dianteiras de ratos com diabetes induzido por aloxano, após tratamento com antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas. Não houve similaridade de resultados entre os teores de proteínas não-colagenosas das patas dianteiras e traseiras, podendo-se concluir apenas que houve redução dos níveis totais de proteínas não-colagenosas nos ratos normais. O trabalho realizado demonstrou que antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas apresentam um potencial na redução dos níveis de proteínas colagenosas em animais com diabetes melito, podendo constituir-se em uma forma alternativa de auxílio nas enfermidades provocadas pelo diabetes melito.

ABSTRACT

FRINHANI, Eduarda de Magalhães Dias, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 1998. **Effect of anthocyanins of red grapes (enocyanins) and extracted anthocyanins of trapoeraba (*Tradescantia pallida*) in normal and diabetic rats.** Adviser: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Committee members: Tânia Toledo de Oliveira and José Humberto de Queiroz.

To evaluating the effect of anthocyanins of *Tradescantia pallida* and of red grapes in normal and diabetic animals, an experimental model was accomplished with albino rats, of the strain *Wistar*, that were fed with commercial ration and a daily dose of 50 mg of the extract of anthocyanin. The experiment had duration of 21 days, in that the level of blood glucose and the corporal weight were evaluated. The content of collagenous and noncollagenous proteins in the bony tissue of front and back paws of the animals was evaluated by the end of the experiment. Diabetes were induced through the intravenous administration of alloxan, to bring up to the dose of 60 mg/kg of corporal weight. This pathology was characterised by the elevation of blood glucose, after four days of application of the alloxan, and also for the increase of the level of collagenous proteins in the bony tissue of the animals, after the 21 days of

treatment. A volume of 6 mL of the aqueous extract of anthocyanins of *Tradescantia pallida*, equivalent to 50 mg of dry weight, was mixed, daily, to the commercial ration. Anthocyanins of *Tradescantia pallida* was extracted, with a ethanol:water (40:60) solution acidified with HCl 0,1%, and partially purified in a cromatography column, that had as stationary phase the polyvinylpyrrolidone. The anthocyanins of red grapes, in the powder form, is used commercially as food colorant, being known as enocyanin. The results showed that anthocyanins of *Tradescantia pallida* and red grapes didn't have a hypoglycemic effect in the diabetic rats. Normal and diabetic rats treated with anthocyanin of red grapes and normal rats treated with anthocyanins of *Tradescantia pallida* presented a gain constant of corporal weight. Diabetic rats treated with anthocyanins of *Tradescantia pallida* lost weight, in spite of they have consumed the same amount of food that the other animals. Was observed a reduction of the levels of proteins collagenous of the bony tissue of the front and back paws of rats with diabetes induced by alloxan, after treatment with anthocyanins of *Tradescantia pallida* and of red grapes. There was not similarity of results between the contents of noncollagenous proteins of the front and back paws, could just be concluded that there was reduction of the total levels of noncollagenous proteins in the normal rats. The accomplished work demonstrated that anthocyanins of *Tradescantia pallida* and of red grapes have a potential in the reduction of the levels of noncollagenous proteins in animals with diabetes mellitus, could be constituted in an alternative form of aid in the illnesses provoked by the diabetes mellitus.

1. INTRODUÇÃO

Propriedades farmacológicas de antocianinas têm sido observadas nas últimas décadas. São conhecidos seu efeito favorável à visão de homens e animais; melhoria das condições vasculares e problemas circulatórios, resultando em prevenção da fragilidade capilar e trombozes; atividade antioxidante; redução dos níveis de colesterol total e conseqüente proteção contra processos arterioscleróticos. É também comprovada a sua ação na redução do nível de colágeno e glicoproteína estrutural em indivíduos diabéticos.

Em indivíduos portadores de diabetes melito, várias propriedades do colágeno são alteradas, podendo contribuir para o desenvolvimento de patologias típicas do diabetes e envelhecimento. Com o avanço da idade, o colágeno, proteína estrutural do tecido conjuntivo, apresenta um aumento no número de ligações cruzadas. A formação dessas ligações no colágeno é resultado da formação de produtos finais de glicosilação, que envolve a reação de redução de um açúcar livre com o grupo amino da proteína. Aumento na concentração de glicose, como o observado em diabéticos, ocorre à proporção que os produtos finais de glicosilação se acumulam nas fibras de colágeno. A formação dos produtos finais de glicosilação e ligações cruzadas do colágeno resultam em um aumento da insolubilidade deste; mudanças das propriedades funcionais e conformacionais do tecido conjuntivo, causando danos na adesão de fatores de

crescimento e nas células osteogênicas; redução da força de resistência dos ossos, conduzindo a uma menor diferenciação; e redução da resistência dos ossos à fraturas. Observam-se, ainda, diminuição da vascularização, arteriosclerose e retardo da cicatrização de feridas.

Efeitos de antocianinas de uvas são relatados na redução da biossíntese do colágeno. Antocianinas de uvas roxas são caracterizadas por terem poucas substituições de açúcares e ácidos no núcleo flavilium. Ao contrário, antocianinas de *Tradescantia pallida*, uma planta ornamental da família das *Commelinaceae*, apresentam alto grau de substituição, inclusive no anel B, o que aumenta em muito a sua estabilidade diante de fatores como temperatura, luz, pH e oxigênio.

O presente trabalho teve como objetivo testar os efeitos de antocianinas extraídas de folhas de *Tradescantia pallida* e antocianinas de uvas roxas, enocianinas, no nível de glicose sangüínea, no peso corporal e nos níveis de proteínas colagenosas e não-colagenosas em ratos normais e com diabetes induzido por aloxano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Antocianinas

As antocianinas estão incluídas no grupo de pigmentos de ocorrência natural, responsáveis pela coloração azul, vermelha, violeta e púrpura de muitas espécies do reino vegetal (STRINGHETA, 1992).

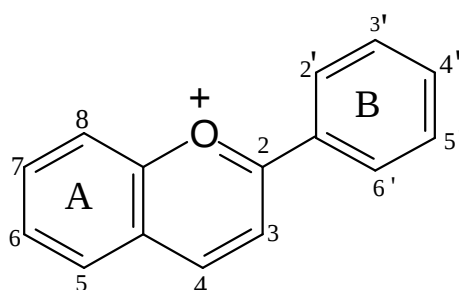
As antocianinas formam as cores de muitas flores, folhas e frutos, sendo provavelmente o corante mais comum, de cor vermelha, em sucos de frutas, vinhos e geleias, e têm sido identificadas em vegetais tão diversos, como maçãs, uvas, morangos, framboesas, cerejas, cascas de batata-doce, cebola-roxa, repolho-roxo, rabanete e ruibarbo, dentre muitos outros (TIMBERLAKE e BRIDLE, 1980; FREUND et al., 1988).

Sintetizadas por quase todas as plantas superiores, as antocianinas caracterizam-se por possuir a estrutura carbônica – $C_6 - C_3 - C_6$ –, fazendo parte, portanto, do grupo de compostos conhecidos coletivamente como flavonóides. Entretanto, apesar de possuírem a mesma origem biossintética, as antocianinas diferem dos outros flavonóides por absorverem fortemente a luz visível (BROUILLARD, 1982; JACKMAN et al., 1987).

As antocianinas encontradas na natureza são glicosídios de antocianidinas, derivadas da estrutura básica do cátion flavilium (Figura 1).

O pigmento antocianina é composto de uma aglicona (antocianidina) esterificada por uma ou mais moléculas de açúcar. Agliconas livres raramente ocorrem em alimentos, exceto, possivelmente em nível de traço, como produto de reações de degradação. Somente cinco açúcares têm sido encontrados como parte das moléculas de antocianinas, a saber, em ordem de abundância: glicose, ramnose, galactose, xilose e arabinose. Antocianinas podem ser também aciladas, o que adiciona um terceiro componente à molécula. Uma ou mais moléculas dos ácidos aromáticos – hidroxicinâmico, p-cumárico, ferúlico, caféico, vanílico e sinápico – e dos ácidos alifáticos – acético, oxálico, malônico, succínico e málico – podem esterificar a molécula de açúcar (FRANCIS, 1985).

Dezenas de antocianidinas são conhecidas, mas somente seis delas (pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina) são encontradas em alimentos (Figura 1). As outras antocianidinas, comparativamente raras, são encontradas em algumas flores e folhas (FRANCIS, 1985).



Cátion flavilium	Substituições					
	3	5	6	7	3'	5'
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	H
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	H
Delphinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe

FONTE: STRACK e WRAY, 1989.

Figura 1 – Cátion flavilium e as principais antocianidinas.

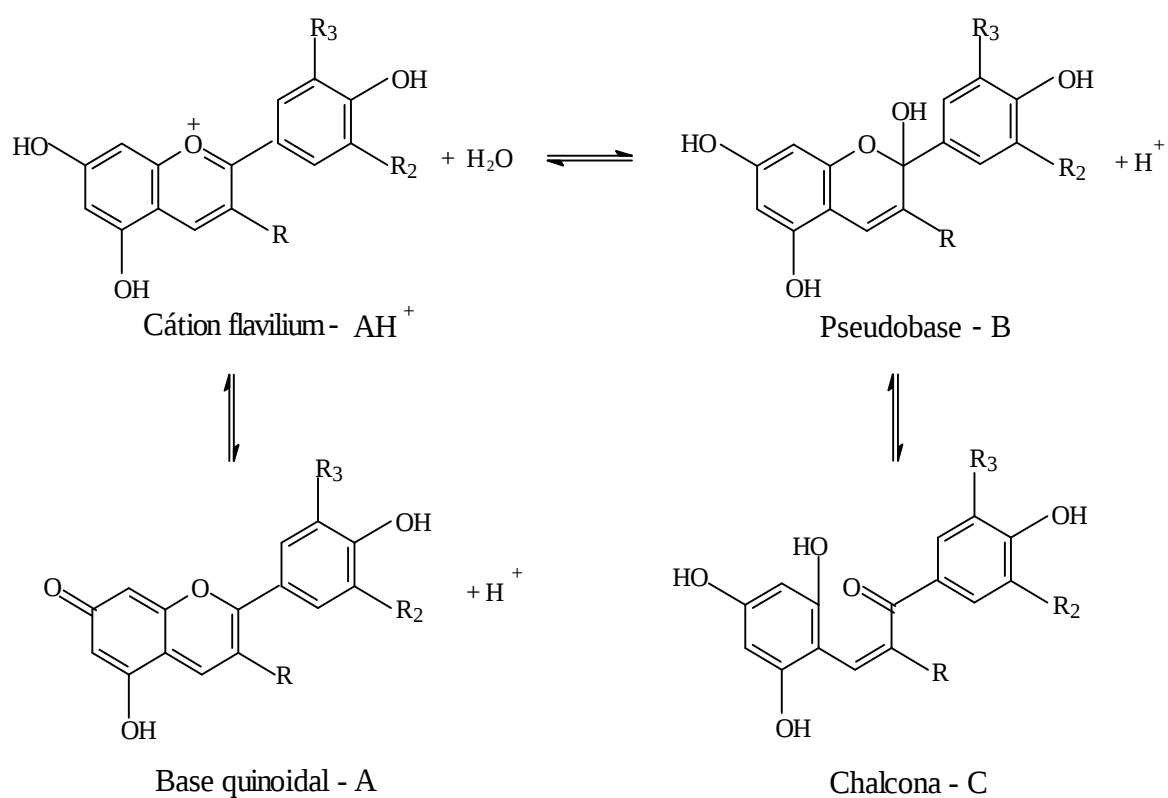
As diferenças entre as várias antocianinas individuais estão no número de grupos hidroxílicos na molécula, no grau de metilação destes grupos, na natureza e no número de açúcares ligados à molécula e na posição dessas ligações, bem como na natureza e no número de ácidos aromáticos e, ou, alifáticos ligados ao açúcar na molécula de antocianina (MAZZA e BROUILLARD, 1987). Antocianidinas são mais instáveis e menos solúveis em água que antocianinas, indicando que a glicosilação confere solubilidade e estabilidade a esses pigmentos (BROUILLARD, 1982).

A cor da antocianina é afetada por hidroxilação, metilação, glicosilação e acilação de moléculas desse pigmento e pelo pH da solução em que ele está dissolvido. Estes efeitos, entretanto, não explicam satisfatoriamente a grande variedade de cores associadas com a presença de antocianinas em tecidos de plantas. OSAWA (1982) propôs que as antocianinas seriam estabilizadas por copigmentos. Os copigmentos são, na maioria das vezes, flavonóides não antociânicos, especialmente flavonóis, alcalóides, aminoácidos, nucleotídeos e outros compostos, como acetaldeído e taninos (ARAÚJO, 1995).

In vivo, a copigmentação pode ocorrer como resultado da livre associação da antocianina com outras substâncias, sendo então chamada de copigmentação intermolecular, ou, quando a concentração de antocianinas é relativamente alta, estas podem atuar como copigmentos de si mesmas, o que é denominado copigmentação intramolecular ou auto-associação (OSAWA, 1982).

A formação do complexo antocianina-flavonóide é uma típica copigmentação intermolecular, e a complexação se dá pela formação de ligações de hidrogênio entre a base quinoideal ou íon flavilium da antocianina e o grupo hidroxila aromático do flavonóide, produzindo um empilhamento horizontal. O grande número de grupos hidroxila da molécula do flavonóide fortalece a formação do complexo (STRINGHETA, 1992).

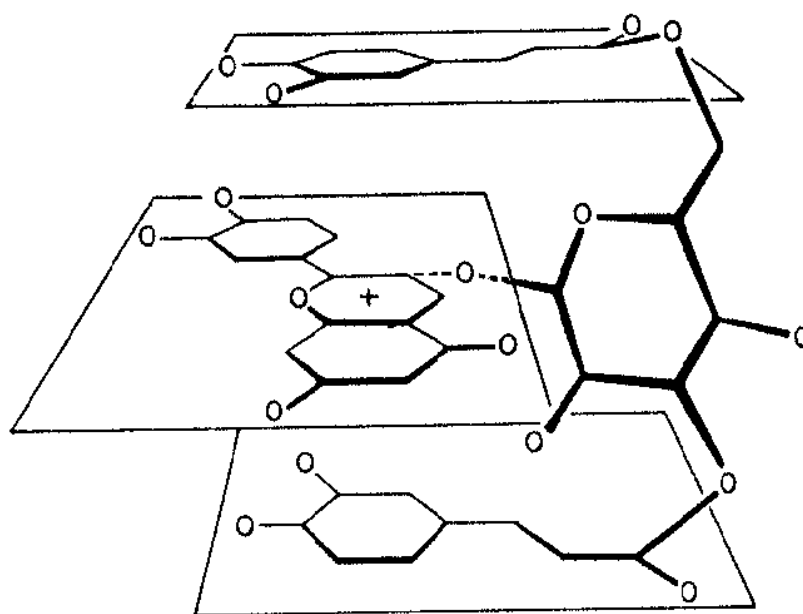
Por muitos anos acreditou-se que as antocianinas só eram glicosiladas no anel A. As antocianinas convencionalmente aciladas no anel A estão sujeitas a mudança de cor com o pH, devido à formação de pseudobase incolor em pH próximo de 4 (Figura 2) (MAZZA e BROUILLARD, 1987).



FONTE: MAZZA e BROUILLARD, 1987.

Figura 2 – Transformações estruturais das antocianinas.

Em 1977, YOSHITAMA encontrou a primeira antocianina substituída no anel B em *Lobelia erinus*, demonstrando, assim, a ocorrência de glicosilação nas hidroxilas 3', 4' e 5'. Um modelo complexo de copigmentação intramolecular, entre antocianinas e seus resíduos de ácidos aromáticos, usualmente acompanha os anéis B substituídos, sendo denominado empilhamento do tipo sanduíche (Figura 3). Cada empilhamento é estabilizado por uma sobreposição de camadas de açúcares hidrofílicos, ligados por ligações de hidrogênio (GOTO e KONDO, 1991).



FONTE: BROUILLARD, 1983.

Figura 3 – Modelo de empilhamento de dois resíduos de ácido caféico com o núcleo pirilium do cátion flavilium.

Na copigmentação intramolecular, os resíduos aromáticos dos grupos acila se alinham com o anel pirilium do cátion flavilium (ligação não-covalente), dificultando a adição da água no C-2 e C-4 do anel. O copigmento protege o cromóforo flavilium, impedindo o ataque nucleofílico da água (hidratação covalente), que induziria à formação de pseudobases e chalconas sem cor. Com a

dificuldade para a hidratação da molécula e o aparente impedimento das reações de transferência de prótons pelo processo de “empilhamento” das moléculas, a estabilidade dos cromóforos aumenta sensivelmente. Como consequência, a copigmentação tende a aumentar a concentração da forma colorida ativa e diminuir a concentração da forma sem cor (STRINGHETA, 1992)

Por essa razão, antocianinas monoaciladas não apresentam estabilidade de cor. A presença de dois ou mais resíduos acila ligados ao açúcar é requerimento fundamental para que haja uma boa estabilidade da cor em soluções neutras (MAZZA e BROUILLARD, 1987).

As antocianinas e antocianidinas apresentam uma absorvância intensa na região compreendida entre os comprimentos de onda de 465 a 550 nm (Banda I) e uma absorvância menos intensa na região entre 270 e 280 nm (Banda II). A posição dos picos varia consideravelmente com a mudança do solvente e do pH das soluções (BOBBIO e BOBBIO, 1985).

À presença de uma banda de absorção extra entre 560-600 nm e ou 600-640 nm atribui-se a tendência em se formar base quinoidal em soluções neutras ou levemente ácidas. Duas formas podem estar presentes, a estrutura 7-ceto ou a forma 4'-ceto. Se a hidroxila na posição 7 é bloqueada por metilação ou glicosilação, então a forma 4'-ceto parece mostrar uma banda de absorção extra no comprimento de onda máximo do visível. As substituições de açúcar no anel B, junto com complexas acilações, favorecem a existência da forma 4'-ceto, freqüentemente sem a substituição na hidroxila 7. A presença de uma banda extra em altos valores de pH é altamente desejável para um corante de utilização em alimentos, porque este poderá ser altamente colorido em valores de pH acima de 4, em que antocianinas convencionais são fracamente coloridas (SHI et al., 1992a). Deste modo, estas antocianinas contêm um complexo acilado, que é, obviamente, mais estável que o de antocianinas de amora ou de preparações de enocianinas, mesmo em valor de pH menor (TEH e FRANCIS, 1988).

A estabilidade adicional nos pigmentos 4'-ceto de *Zebrina pendula* em um modelo de bebida foi confirmado por TEH e FRANCIS (1988).

2.2. Antocianinas de uvas

Apesar de largamente disseminadas na natureza, são poucas as fontes de antocianinas utilizáveis comercialmente, destacando-se as cascas de uvas como subproduto da indústria do vinho (ARAÚJO, 1995). Estas contêm altas concentrações de pigmentos antociânicos, os quais estão disponíveis comercialmente sob o nome genérico de enocianinas (FRANCIS, 1992).

Os processos de obtenção das enocianinas incluem extrações com solução aquosa de anidrido sulfuroso ou com solventes alcoólicos acidificados. O produto final pode estar na forma de líquido concentrado, pasta ou pó (MARKAKIS, 1982).

As uvas, dependendo da variedade, contêm cerca de 25 pigmentos, os quais são basicamente mono e diglicosídeos das seis antocianidinas mais comuns relacionadas na Figura 1. Os corantes comerciais derivados de uvas geralmente têm uma porção apreciável de pigmentos polimerizados (acima de 50% ou mais), dependendo do tempo de produção do corante e do tratamento ao qual ele foi submetido (FRANCIS, 1992).

Antocianinas derivadas de uvas têm sido utilizadas como corantes alimentares por muitos anos, embora haja limitações no seu emprego em razão de mudanças de pH do meio e problemas de estabilidade dos pigmentos, visto que antocianinas reagem com ácido ascórbico, metais, açúcares e oxigênio, sofrendo influência da luz e temperatura, além da ação de enzimas, que produz polímeros e produtos de degradação (FRANCIS, 1992).

As antocianinas, de modo geral, não são estáveis ao aquecimento prolongado. Em temperaturas acima de 60 °C ocorre hidrólise da ligação 3-glicosídica com abertura hidrolítica do anel e formação do derivado chalcona, que se degrada a compostos escuros insolúveis de natureza polifenólica. Escurecimento e perda de coloração também podem ocorrer durante armazenamento, sendo recomendado o uso de baixas temperaturas. A estabilidade das antocianinas à degradação térmica aumenta com a diminuição do pH e ausência de oxigênio (ARAÚJO, 1995).

2.3. Antocianinas de *Tradescantia pallida*

Antocianinas derivadas de plantas ornamentais têm, em geral, um grau de acilação maior que o das originadas de frutas e vegetais comuns, tendo se mostrado notavelmente estáveis em soluções aquosas neutras ou levemente ácidas. Um exemplo são as antocianinas da planta ornamental *Tradescantia pallida*, da família das Commelinaceae, que apresentam alto grau de acilação e substituição no anel B (BAUBLIS e JIMÉNEZ, 1995).

A *Tradescantia pallida*, também denominada *Setcreasea purpurea*, é conhecida popularmente como coração-roxo ou trapoeraba. É uma planta originária do México, pouco exigente e bem resistente a pragas e doenças (MACHADO, 1996).

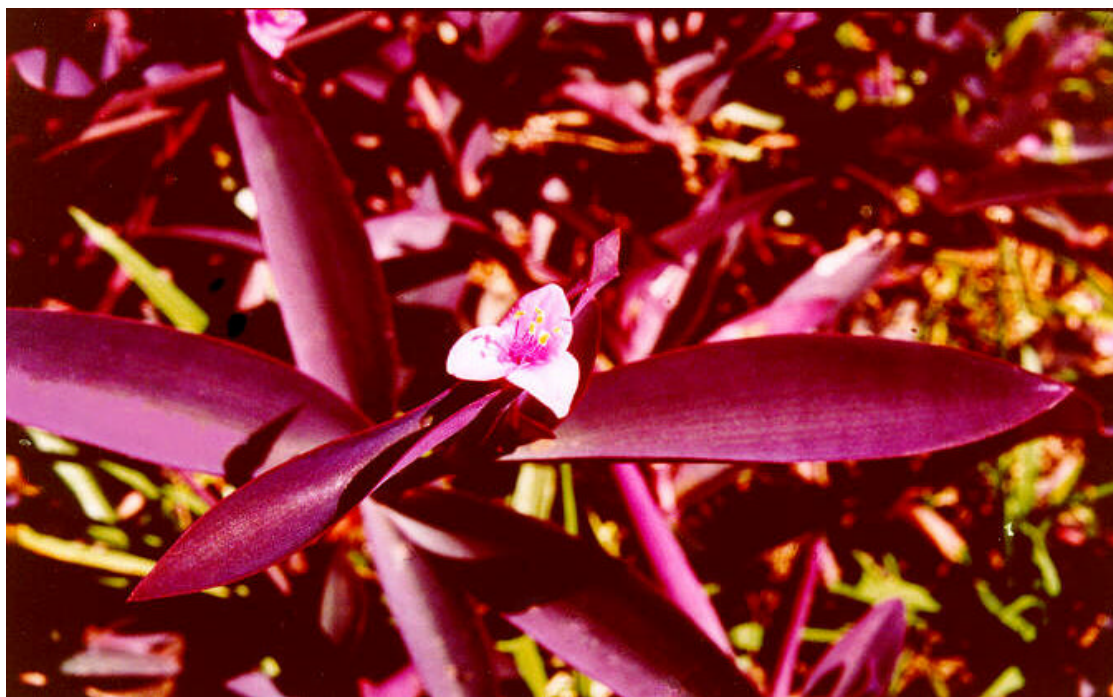
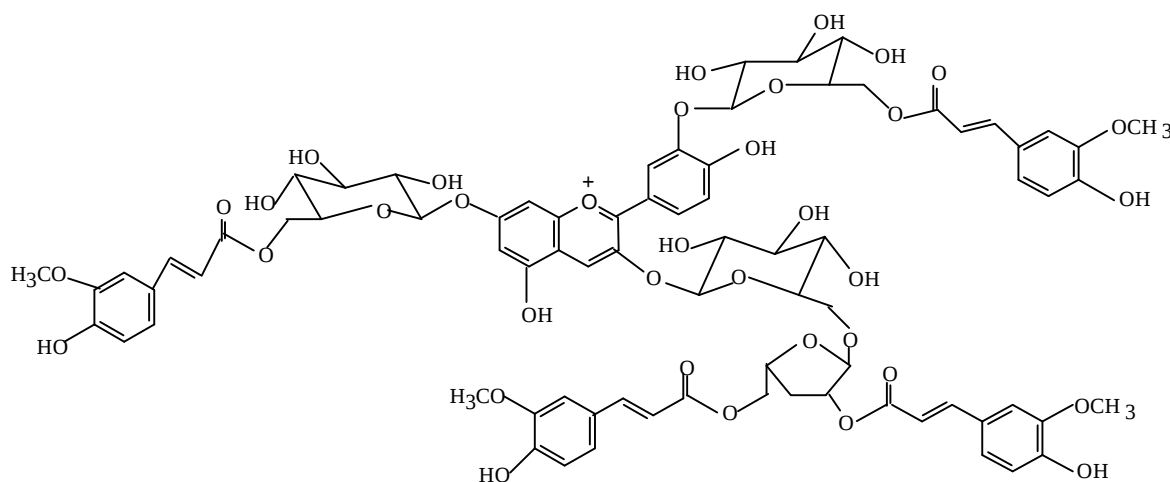


Figura 4 – Folhas e flores de *Tradescantia pallida*.

A estrutura da principal antocianina de *Tradescantia pallida* foi determinada por SHI et al. (1993), por espectrometria de massa e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como cianidina-3,7,3'- triglicosídeo com três moléculas de ácido ferúlico, uma molécula de ácido cafeíco e uma de glicose terminal. Um segundo pigmento idêntico, exceto pela ausência da unidade de glicose terminal, também estava presente.

BAUBLIS e JIMÉNEZ (1995), por meio de hidrólises químicas, espectrometria de massa e RMN H, caracterizaram a principal antocianina da *Tradescantia pallida* como 3-O-[6-O-[2,5-di-O-(E)-feruloil- α -L-arabinofuranosil]- β -D-glucopiranosil]-7,3'-di-O-[6-O(E)feruloil- β -D-glucopiranosil] cianidina (Figura 5).



FONTE: BAUBLIS e JIMÉNEZ, 1995.

Figura 5 – Estrutura da Antocianina da *Tradescantia pallida*.

SHI et al. (1992 a) compararam a estabilidade de antocianinas de amoras (cianidina-3-glicosídeo) com a de uma amostra comercial de enocianina de uvas e a de antocianinas de *Tradescantia pallida* solubilizadas em um sistema-modelo composto de tampão citrato-fosfato em valores de pH 3,5; 4,5; e 5,5 e 15% de sacarose. A amostra de *Tradescantia pallida* mostrou-se mais estável que as

outras duas, em todos os valores de pH estudados, apresentando uma banda extra de absorção em 583 nm, devido à forma 4'-ceto, que forneceu uma boa coloração em pH 5,5.

SHI et al. (1992c) também desenvolveram uma metodologia para comparar quantitativamente a estabilidade de antocianinas de repolho-roxo (*Brassica oleracea*) e de *Tradescantia pallida* em bebidas sem açúcar e em um sistema de proteínas de peixes. A antocianina de *Tradescantia pallida* mostrou-se cerca de 29 vezes mais estável que a do repolho-roxo no sistema de bebidas sem açúcar e 15 vezes mais estável no sistema de proteínas de peixes.

2.4. Extração e purificação de antocianinas

A extração de antocianinas é comumente acompanhada por maceração do material da planta (raízes, caules, folhas, flores) com soluções de HCl 0,1 mol/L a 1% em metanol ou etanol, a baixas temperaturas. Para facilitar a extração, a adição de 10 a 50% de água pode ser necessária, dependendo do material da planta. Os extratos podem ser cuidadosamente concentrados a vácuo a 30 °C e devem ser estocados a -20 °C ao abrigo de luz (FRANCIS, 1982; STRACK e WRAY, 1989).

Para a purificação e identificação de antocianinas e agliconas em trabalhos preparativos, recomenda-se cromatografia em papel Whatman nº 3, com o uso de vários solventes, que também são aplicáveis em trabalhos analíticos com papel Whatman nº 1, ou cromatografia em camada delgada em celulose (FRANCIS, 1982). Para comparação de valores de R_f, a fase superior do sistema n-butanol:ácido acético:água (BAW), na proporção de 4:1:5, é o solvente mais popular, junto com n-butanol:ácido clorídrico 2 mol/L (1:1, fase superior, BHCl), HCl 1% ou o sistema, ácido acético:HCl conc.:água (15:3:82) (STRACK e WRAY, 1989).

As antocianinas podem ser isoladas a partir do extrato bruto, mas, em muitos casos, podem ser prefracionadas por cromatografia em coluna aberta. Separações têm sido feitas em alumina, resinas de troca catiônica, magnesol,

sílica ácida, celulose em pó, poliamida e filtração em gel, usando-se sephadex (HRAZDINA, 1970). As vantagens e desvantagens do uso das resinas para as colunas mencionadas anteriormente são extensivamente discutidas por SEIKEL (1962).

A cromatografia em polivinilpolipirrolidona, Polyclar AT, mostrou-se promissora para a separação de antocianinas em grandes quantidades, permitindo o uso direto de extratos de plantas sem procedimentos de purificação preliminares (HRAZDINA, 1970). O oxigênio na ligação peptídica de polovinilpolipirrolidonas (PVPP) pode formar fortes ligações de hidrogênio com o próton de grupos fenólicos. Esta propriedade tem sido usada com sucesso na remoção de compostos fenólicos durante o isolamento de enzimas de plantas (WROLSTAD e PUTNAM, 1969). HRAZDINA (1970) separou 3,5-diglicosídeos de peonidina, petunidina, cianidina, malvidina e delphinidina de uvas, usando cromatografia em coluna aberta em PVPP. Estes cinco pigmentos diferem em número de grupos metoxilas e ou fenólicos.

TANCHEV e TIMBERLAKE (1969) purificaram extensivamente antocianinas de repolho-roxo, utilizando cromatografia em coluna com o suporte polivinilpolipirrolidona (Polyclar AT) e o solvente metanol:ácido clorídrico (97:3, v/v). Posteriormente, o extrato foi purificado em uma coluna cromatográfica com celulose, usando ácido acético:ácido clorídrico, seguido por butanol:ácido clorídrico.

Segundo SHI et al. (1993), os métodos clássicos de identificação de antocianinas, como cromatografia em papel, funcionam muito bem com estruturas relativamente simples, mas são inadequados para compostos multi-acilados no anel B. Espectrometria de massa com rápido bombardeamento de átomos (FAB-MS) e espectrometria de massa com íon líquido secundário (LSI-MS) foram métodos utilizados por SHI et al. (1993) para a identificação de antocianinas de *Tradescantia pallida* e têm sido muito aplicados na determinação do peso molecular de antocianinas.

SHI et al. (1992b) desenvolveram um método baseado na proporção de ácidos para açúcares e, ou, agliconas, usando cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE). Este método foi usado para confirmar a identificação de pigmentos em batata-doce (*Ipoema batatas*) e *Tradescantia pallida*.

Métodos analíticos para uma mistura de antocianinas por CLAE têm sido largamente desenvolvidos, mas a aplicação desta técnica para o isolamento de antocianinas em uma complexa mistura de extrato de plantas é limitada. IDAKA et al. (1987) realizaram a separação de antocianinas altamente aciladas de plantas, usando CLAE com a resposta sendo dada em três dimensões. Estas antocianinas foram caracterizadas, utilizando-se espectros de massa, hidrólise alcalina e comparação de absorvância nas regiões espectrais do visível e ultravioleta.

2.5. Toxicologia e propriedades farmacológicas de antocianinas

Segundo a Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1982), a disponibilidade de informações sobre antocianinas sugere que estas sejam pouco absorvidas pelo trato gastrointestinal. O metabolismo no animal é limitado, podendo ser devido a transformações das antocianinas por enzimas produzidas pela flora bacteriana. Metabólitos de antocianinas ainda não foram identificados.

POURRAT et al. (1967) determinaram a dose letal (DL₅₀) de antocianinas (mistura de cianidina, petunidina e delphinidina extraídas de groselha, mirtilo e baga de sabugueiro). Este autor testou doses de 0 a 25.000 mg/kg em ratos e doses de 0 a 20.000 mg/kg de peso corporal em camundongos, por diferentes vias de aplicação (Quadro 1). Concluiu haver ausência de toxicidade por via oral, relatando que doses tóxicas por via intravenosa ou intraperitonal produziram sedação, convulsão e, finalmente, morte.

Antocianinas (extrato de groselha, mirtilo e baga de sabugueiro) não apresentaram efeito teratogênico em ratos, camundongos e coelhos quando foram administradas doses de 1,5; 3 ou 9 g/kg por três gerações sucessivas.

A administração de antocianinas por via oral (5.000 mg/kg) ou intraperitonal (500 mg/kg) em coelhos não causou nenhuma alteração na pressão

arterial. Entretanto, injeção intravenosa de solução de antocianinas (100 a 200 mg/kg) causou ligeira hipotensão, acompanhada de diminuição da amplitude respiratória. Com injeção intravenosa (25 mg/kg) observaram-se efeitos diuréticos e uma vasodilatação das artérias coronárias de coelhos.

Quadro 1 – Valores de DL₅₀ para ratos e camundongos

Animais	Via de aplicação	DL ₅₀ (mg/kg de peso corpóreo)
Ratos	Intraperitonal	4110
	Intravenosa	840
	Oral	25000
Camundongos	Intraperitonal	2850
	Intravenosa	240
	Oral	20000

FONTE: POURRAT et al., 1967.

Os efeitos das antocianinas extraídas de uvas *Vitis labrusca* foram avaliados extensivamente durante 90 dias na reprodução de cães e ratos. Não foi observado nenhum efeito colateral em cães Beagle machos, fora um menor consumo de alimentos e, conseqüentemente, perda de peso durante as cinco primeiras semanas de estudo. As fezes, os dentes e as gengivas ficaram coloridos quando foram usados níveis elevados de antocianinas na dieta (7,5 e 15%). O corante foi incorporado no mesmo nível na dieta dos ratos durante o estudo de duas gerações e causou perda de paladar, sendo afetado o consumo de alimentos, e perda de peso de alguns órgãos, como o fígado. Entretanto, não foi observado nenhum outro efeito colateral em estudos em que se estabeleceu um nível de 7,5% de antocianinas na dieta, equivalente a cerca de 5 mg/kg de peso corporal/dia (TIMBERLAKE e HENRY, 1988).

Há cerca de 20 anos, as antocianinas foram relatadas como causadoras de um efeito favorável à visão de homens e animais, como rápida adaptação ao

escuro (TIMBERLAKE e HENRY, 1988). POURRAT et al. (1967) observaram melhores condições vasculares de 73-97% quando preparados de antocianinas de mirtilo, cassis e vinho de uvas roxas foram administrados a 8.000 pacientes na Europa.

Efeitos fisiológicos de antocianinas foram observados na prevenção da fragilidade capilar. Muitos trabalhos nesta área têm sido feitos com preparações farmacêuticas do extrato comercial de antocianinas de *Vaccinium myrtillus*, que são largamente usadas no tratamento de vários problemas microcirculatórios. Outros estudos mostraram que as antocianinas de *Vaccinium myrtillus* têm potencial para a prevenção de trombozes (MORAZZONI e MAGISTRETTI, 1986).

Vaccinium myrtillus administrado oralmente em ratos exerce significativa atividade preventiva e curativa antiúlcera. Formulações farmacêuticas, contendo antocianinas e antocianidinas para o tratamento de distúrbios na circulação sanguínea, foram patenteadas no Japão (TIMBERLAKE e HENRY, 1988). Outros estudos têm mostrado que antocianinas apresentam atividade antiinflamatória (TAMURA e YAMAGAMI, 1994) e anticonvulsivante (DRENSKA et al., 1989).

Estudos de antocianinas de *Atsumi-kabu* (*Brassica campestris* L.) e seus efeitos no nível de colesterol de ratos indicaram aumento no nível de HDL-colesterol e redução do colesterol total em ratos alimentados com uma dieta rica em colesterol e ácido cálcico, sugerindo uma proteção contra processos arterioscleróticos (IGARASHI et al., 1990).

BETTINI et al. (1993) estudaram a influência de antocianosídeos de *Vaccinium myrtillus* no processo de relaxamento induzido por acetilcolina em artérias coronárias de bovinos e concluíram que *Vaccinium myrtillus* aumenta esse relaxamento induzido, estimulando tanto a liberação de prostaciclina como o fator de relaxamento derivado do endotélio.

TSUDA et al. (1994) estudaram a atividade antioxidante de antocianinas 3-O- β -D-glicosídeo e cianidina isolados de *Phaseolus vulgaris* L. e concluíram que estes pigmentos podem representar papel importante na prevenção da

peroxidação lipídica de membranas celulares, evitando a ação dos radicais livres, que estão associados ao envelhecimento e à carcinogênese em humanos. TAMURA e YAMAGAMI (1994) verificaram a ação antioxidativa de antocianinas monoaciladas isoladas de uvas *Muscat bailey* A. e compararam esta ação com a de compostos antioxidantes, como α -tocoferol, (+)-catequina e naringenina, encontrando efeito antioxidante maior nas antocianinas. As propriedades antioxidativas de antocianinas, compostos flavonóides e fenólicos encontrados em vegetais, frutos e no vinho, especialmente o tinto, o qual é incluído amplamente e de forma mais constante na dieta de alguns povos, talvez possam explicar melhor a menor incidência de arteriosclerose, doença arterial coronariana e tendências trombogênicas observadas nesses povos, visto que o processo de peroxidação lipídica assume grande importância nesses processos patológicos (KINSELLA et al., 1993).

Laguer et al. (1979), citados por TIMBERLAKE e HENRY (1988), em um ensaio clínico com 54 pacientes diabéticos, forneceram 500-600 mg/dia de antocianinas de *Vaccinium myrtillus* (VMA) por 8 a 33 meses, observando normalização quase total do colágeno polimérico e redução de 30% na glicoproteína estrutural, os quais causam estreitamento dos capilares sangüíneos em indivíduos diabéticos. Resultados obtidos em nível celular, usando *Vaccinium myrtillus*, vêm confirmando os testes clínicos. BONIFACE et al. (1986) também observaram VMA como redutora da biossíntese de colágeno polimérico e glicoproteína estrutural. POURRAT et al. (1967) não observaram nenhum efeito hipoglicêmico quando antocianinas foram administradas em coelhos.

2.6. Tecido ósseo

O osso é composto de uma mistura de fibras de colágeno e mucopolissacarídeos, mineralizado por sais de cálcio nos osteócitos. Desempenha papel estrutural primário, protege tecidos delicados, fornece meio de sustentação para as articulações e atua como reservatório de minerais, tais como cálcio, fósforo, sódio e magnésio, cujo metabolismo e distribuição são

homeostaticamente regulados por vários hormônios, como calcitonina, paratormônio e vitamina D (SMITH et al., 1988).

As principais células do tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos sintetizam as fibrilas de colágeno da matriz orgânica, os osteócitos ajudam na manutenção da matriz óssea, e os osteoclastos estão ligados à reabsorção óssea, que faz parte do processo contínuo de remodelação óssea (ZIPKIN, 1973).

2.6.1. O colágeno

O tecido ósseo é formado de matrizes orgânicas e minerais. De acordo com VOUGHAN (1970), a matriz orgânica é constituída basicamente de proteínas colagenosas e da fração não-colagenosa. Segundo o autor, o colágeno forma 90% da matriz óssea e tem sido identificado como uma única espécie de proteína. O colágeno, sendo proteína fibrosa, é não só a maior proteína extracelular dos tecidos conjuntivo e ósseo, mas também a mais abundante dos vertebrados superiores, correspondendo a um terço do total das proteínas do corpo. Os tipos de colágeno estão indicados no Quadro 2.

Quadro 2 – Tipos de colágeno

Tipo	Tecidos	Características
I	Tecidos conjuntivos	Baixa glicosilação de hidroxilisina
II	Cartilagem	Alta glicosilação de hidroxilisina
III	Pele, artérias e útero	Hidroxiprolina; cadeias com ligações dissulfeto
IV	Membranas basais	Hidroxiprolina e alta glicosilação de hidroxilisina; amplo domínio globular
V	Matriz intersticial	Similar ao tipo IV

FONTE: PROCKOP e WILLIANS, 1982.

A formação de fibrilas de colágeno é um processo complexo, com reações tanto no meio intracelular quanto no extracelular. No interior da célula ocorrem os seguintes eventos: síntese de moléculas protocologênicas, hidroxilação de alguns resíduos de prolina e lisina, glicosilação dos resíduos hidroxilisina para formar monômeros de procolágeno, e exteriorização de procolágeno como trímeros de configuração helicoidal. Do lado externo da célula há uma hidrólise proteolítica limitada do procolágeno para formar tropocolágeno, que em seguida forma a matriz fibrilar (WASSERMAN, 1984).

A composição primária do colágeno comprova a ausência de L-tripisina (Trp) e L-cistina (Cis) e a existência de pequena quantidade de L-tirosina (Tir), L-Histidina (His) e L-metionina (Met). No entanto, colágeno de diferentes espécies contém em média 35% de glicina (Gli), 12% de L-prolina (Pro), 11% de alanina (Ala) e 9% de hidroxiprolina (VOUGHAM, 1970).

Numerosos resíduos de prolina e hidroxiprolina proporcionam uma conformação rígida e com curvaturas curtas, ficando as três cadeias peptídicas helicoidais firmemente enroladas uma em volta da outra. As subunidades se encontram solidamente unidas com outras fibrilas por ligações cruzadas formadas às expensas de resíduos de lisina e hidroxilisina. A formação de ligações cruzadas começa pela oxidação de certos resíduos de lisina em lisinaldeído, denominada também alisina (oxidação da função amina primária do aldeído). Um resíduo de alisina reage com um resíduo de lisina ou de hidroxilisina, formando uma base de Schiff por perda de uma molécula de água. Esta união é instável e se estabiliza por migração interna de hidrogênio. Quanto mais ligações cruzadas contiver o colágeno, mais estável, resistente e sólido ele se tornará (BOREL et al., 1989).

A formação de hidroxiprolina a partir da prolina ocorre somente após a síntese da molécula de colágeno ter se completado. A enzima prolina hidroxilase acompanha a conversão oxidativa da prolina em hidroxiprolina. Um número importante de cofatores, como o ácido ascórbico, é requerido para uma completa atividade desta enzima. Existe evidência de que um polipeptídeo precursor do colágeno, rico em prolina, preferivelmente a hidroxiprolina, denominado

procolágeno, seja um intermediário na biossíntese do colágeno. Procolágeno age como substrato para a prolina hidroxilase (POTTS e DEFTOS, 1969).

À medida que o ser humano envelhece, mais interligações covalentes se formam no interior e entre as unidades de tropocolágeno, tornando as fibrilas de colágeno dos tecidos conjuntivos mais rígidas e quebradiças. Como o colágeno está presente em tantas estruturas, o aumento da rigidez e fragilidade com a idade altera as propriedades mecânicas de tendões e cartilagens, torna os ossos menos resistentes e provoca diminuição da transparência da córnea ocular (LEHNINGER, 1985).

2.6.2. Proteínas não-colagenosas

Técnicas modernas de análise possibilitaram o isolamento de grande número de proteínas não-colagenosas da matriz de tecidos conjuntivos mineralizados. As proteínas não-colagenosas parecem estar envolvidas na secreção, montagem, maturação, mineralização e, ou, manutenção da matriz extracelular. As principais proteínas não-colagenosas do osso são aniônicas, e uma das mais abundantes é a osteonectina, que parece ser a promotora da mineralização (BOSKEY, 1989).

A osteocalcina, que contém ácido γ -carboxiglutâmico, sintetizada pelos osteoblastos, é a proteína não-colagenosa mais abundante no osso adulto (YOON et al., 1988). A osteocalcina representa 1% do total das proteínas do osso. Esta proteína, de 6.500 daltons, é formada por 49 aminoácidos, dos quais quatro são ácidos γ -carboxiglutâmicos, e não apresenta hidroxiprolina (HAUSCHKA et al., 1975; PRICE et al., 1976). Sua função é bastante discutida, mas sabe-se que esta proteína tem a propriedade de se ligar ao Ca^{++} por meio do ácido γ -carboxiglutâmico e pode associar-se com micelas de fosfolipídios do plasma (LIAN et al., 1982). Uma relação das principais proteínas não-colagenosas dos ossos é apresentada no Quadro 3.

Quadro 3 – Proteínas não-colagenosas dos ossos

Nome	Quantidade	Função
Proteolipídio calcificável	-----	Mineralização
Proteoglicanas	4 – 10 %	Mineralização
Osteonectina	23 %	Mineralização
Fosfoproteínas	9 %	Mineralização
Sialoproteína (BSP I)	8 - 12 %	Adesão das células
BSP II	< 1 %	Organização da matriz
Osteocalcina (Gla proteína)	15 – 20 %	Mineralização
Matriz Gla proteína	2 %	Mineralização
BP2	?	Mineralização
BMP	-----	Morfogênese
Fatores de crescimento	-----	Regulação celular
Glicoproteína acídica	-----	Mineralização

FONTE: BOSKEY, 1989.

A porção mineral do osso consiste de duas fases de fosfato de cálcio – fosfato de cálcio não cristalino ou amorfo e apatita pouco cristalizada –, sendo química e fisicamente distintas (POSNER, 1973). Na mineralização do osso, a fase amorfa é depositada primeiro, e, subsequente, uma porção é convertida em apatita. O osso jovem é mais rico em fosfato de cálcio amorfo que em fosfato de cálcio de apatita, enquanto o osso maduro contém mais a fase cristalina que a fase amorfa.

A porção mineral do tecido ósseo está em troca constante com os constituintes do plasma, apresentando inter-relações metabólicas com os fluidos corporais, que servem de reserva de minerais. Mais de 90% do cálcio e 95% do fósforo corporal estão presentes no tecido ósseo. A estrutura química exata dos ossos não é inteiramente conhecida em razão da complexidade da estrutura química dos fosfatos (SMITH et al., 1988).

As hidroxiapatitas parecem ser os principais sais de cálcio e fósforo. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto,

uma camada iônica em volta do cristal, denominada capa de hidratação, que facilita a troca de íons entre o cristal e o fluido intersticial (WINDLE, 1976). A associação da hidroxiapatita com as fibras de colágeno da matriz orgânica é responsável pela dureza e resistência características do tecido ósseo.

2.7. Diabetes melito e desordens no metabolismo

O diabetes melito é definido como uma síndrome caracterizada por níveis elevados de glicose sangüínea, em situações de jejum, além de ser acompanhado por alteração do metabolismo de carboidratos e também de lipídeos e proteínas, sendo essas alterações uma consequência do déficit da secreção ou da ação da insulina (PALLARDO, 1997).

Os níveis da glicose sangüínea são mantidos pela glicose originada dos carboidratos da dieta e do glicogênio do fígado. Ao entrar na corrente sangüínea, a glicose é rapidamente enviada para as células, onde pode ser utilizada como energia (oxidação celular) e convertida em glicogênio para armazenagem no fígado ou músculo (gliconeogênese) ou, em gordura, para armazenagem em tecido adiposo (lipogênese).

O transporte da glicose ao interior da maioria das células depende da presença de insulina anexa aos locais receptores nas membranas celulares. Na ausência de insulina suficiente ou na presença de eficácia reduzida de insulina, a glicose não pode atravessar a membrana da célula, acumulando-se, por isso, no sangue e levando à hiperglicemia e glicosúria. Exceções são o cérebro, o fígado, os cristalinos dos olhos, as hemácias e a medula renal, nos quais a glicose está apta a difundir através da membrana da célula sem a intervenção da insulina.

O diagnóstico do diabetes melito é feito, geralmente, medindo-se a glicose plasmática de jejum, às vezes, combinada com um teste de tolerância à glicose oral ou uma glicose pós-prandial plasmática. Sendo o nível normal de glicose no plasma de 70 a 115 mg/dL, um diagnóstico de diabetes é feito se, em duas ocasiões separadas, o nível de glicose plasmática em jejum for maior que 140 mg/dL (MAHAN e KRAUSE, 1994).

Uma alteração metabólica característica do diabetes é a excessiva, mas incompleta, oxidação dos ácidos graxos no fígado, resultando na produção elevada das substâncias cetônicas acetoacetato e β -hidroxibutirato, que não podem ser usadas pelos tecidos periféricos tão rapidamente quanto são sintetizadas no fígado. Em adição ao β -hidroxibutirato e ao acetoacetato, o sangue dos diabéticos também contém acetona, que resulta da descarboxilação espontânea do acetoacetato.

Outra característica do diabetes é uma excreção elevada de uréia, principal produto de excreção nitrogenada da degradação oxidativa de aminoácidos. A degradação oxidativa excessiva dos aminoácidos nos diabéticos reflete grande aumento na taxa de gliconeogênese.

Marcante e bastante séria é a grande diminuição do pH sangüíneo no diabetes não controlado, que pode cair até para 6,8, sendo o valor normal em torno de pH 7,4. A acidez aumentada é devida à extensa formação de substâncias cetônicas no fígado e sua liberação no sangue (LEHNINGER, 1985).

A insulina promove a síntese dos ácidos graxos no fígado, além de um armazenamento subsequente de gordura, por estimular a atividade da enzima lipoprotéica lipase, que exerce, entre outras, função de facilitar a captação de triglicerídios pelo tecido adiposo. Na ausência de insulina ou eficácia de sua atividade, a lipólise é acionada, aumentando os ácidos graxos livres, triacilgliceróis, colesterol e fosfolipídios no sangue.

A insulina promove, também, o transporte dos aminoácidos através da membrana da célula num sistema de transporte similar ao da glicose e a síntese protéica no tecido muscular e no fígado. Na ausência de insulina suficiente, os aminoácidos são desaminados, e a porção não nitrogenada é usada para sintetizar a glicose ou ácidos graxos (MAHAN e KRAUSE, 1994).

Em indivíduos portadores de diabetes melito, uma ou mais propriedades do colágeno são alteradas em caminhos que levam à aceleração do envelhecimento (HAMLIN et al., 1975). Com o avanço da idade, o colágeno, proteína estrutural do tecido conjuntivo, desenvolve um aumento no número de ligações cruzadas (VERZÁR, 1964), que pode ser avaliado por vários

parâmetros, tais como testes de desnaturação química, digestibilidade e solubilidade de colágeno (BEHERA e PATNAIK, 1979).

Sendo o aumento das ligações cruzadas no colágeno uma indicação do envelhecimento fisiológico, BEHERA e PATNAIK (1979) avaliaram a aceleração do envelhecimento do colágeno em diabéticos. Camundongos com diabetes induzido por aloxano apresentaram uma redução do nível de solubilidade de colágeno de ossos, pele e tendão, após 4 e 28 dias de tratamento. Isto sugere que, em ratos com diabetes induzido por aloxano, há formação de metabólitos que podem acelerar o envelhecimento do colágeno. Os autores também sugerem que a causa da aceleração do envelhecimento do colágeno pode ser devida a fatores como a presença de inibidores de collagenases ou de aldeídos ou de outros metabólitos.

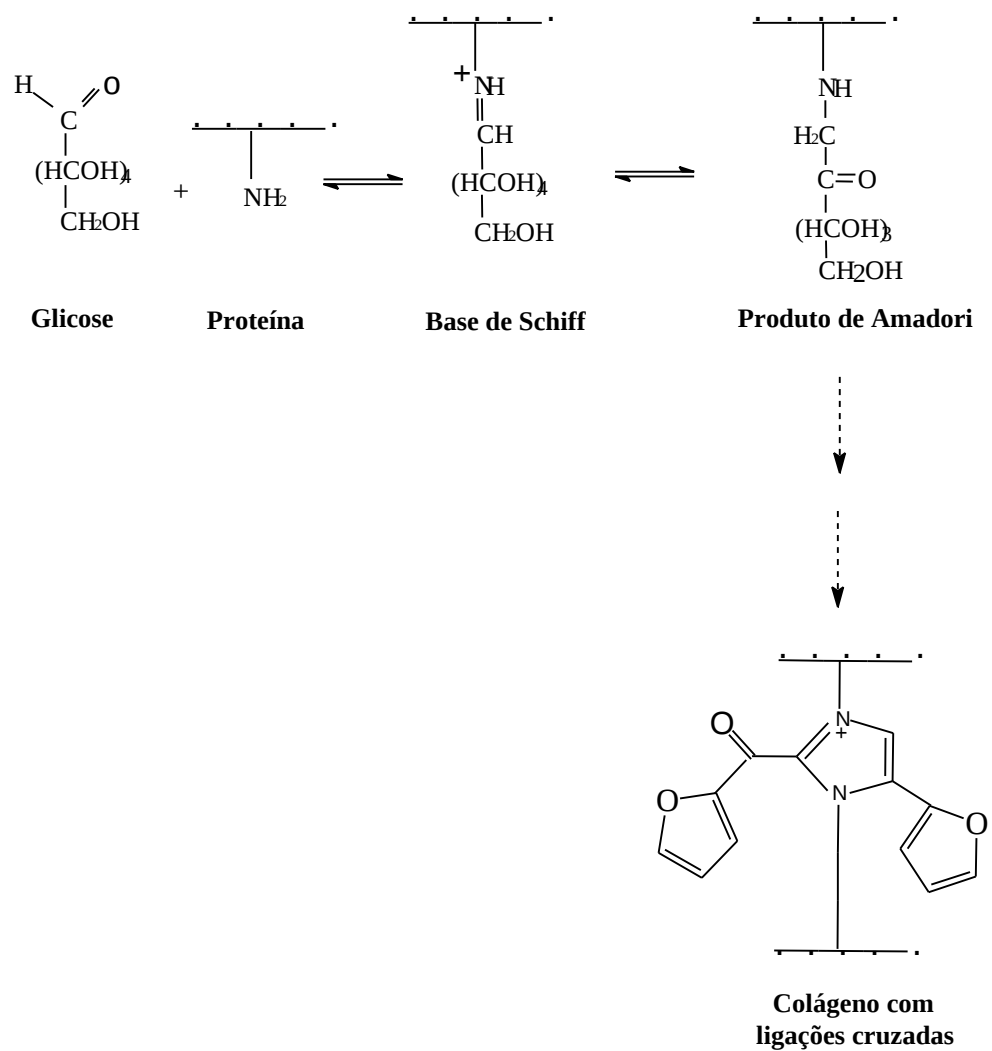
REGNAULT et al. (1973) observaram que, em pacientes diabéticos, a porcentagem de ^3H -prolina aumenta no colágeno polimérico e diminui no colágeno solúvel. Este aumento da polimerização do colágeno no diabetes parece estar paralelo com o aparecimento de ligações cruzadas do colágeno e no espessamento das membranas dos tecidos conjuntivos.

De acordo com DECKER (1977), o colágeno, quando formado, é solúvel e as ligações cruzadas progressivamente aumentam, formando o colágeno insolúvel. Em diabéticos, este processo é acelerado, tornando o colágeno resistente à lise. Diabéticos sofrem espessamento dos capilares causados pelo aumento do colágeno polimérico e da glicoproteína estrutural (Laguer et al., 1979, citados por TIMBERLAKE e HENRY, 1988).

Diabetes induzido experimentalmente tem mostrado diminuição da vascularização e retardo da cicatrização de feridas. O colágeno, principal proteína do tecido conjuntivo, é afetado na maioria dos diabéticos. MOHANAM e BOSE (1981), estudando a atividade de ^3H -hidroxiprolina no colágeno solúvel e insolúvel de ratos com diabetes induzido por aloxano e estreptozotocina, observaram diminuição da síntese e aumento do catabolismo de colágeno, acompanhados por uma conversão do colágeno solúvel para insolúvel.

TOMASEK et al. (1994) relataram o aumento da formação de ligações cruzadas do colágeno de tecido conjuntivo nos ossos de ratos diabéticos e idosos. A formação de ligações cruzadas no colágeno é resultado da formação de produtos finais da glicosilação. O processo de glicosilação envolve a reação de redução de um açúcar livre com o grupo amino de uma proteína, para formar uma base de Schiff quimicamente reversível. Esta base sofre um rearranjo reversível para uma forma mais estável, o produto de Amadori. Este produto sofre uma série de reações para formar os produtos finais da glicosilação, tais como o recentemente caracterizado produto final de glicosilação, 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazol (BROWNLEE et al., 1986), que podem reagir com os grupos aminos de outras proteínas e formar ligações cruzadas covalentes irreversíveis (Figura 6). Os produtos finais da glicosilação vão-se acumulando ao longo da vida na forma de proteínas, como o colágeno.

Uma elevação na concentração de glicose, como a observada em diabéticos, aumenta a proporção em que os produtos finais de glicosilação se acumulam nas fibras de colágeno. Segundo TOMASEK et al. (1994), a formação dos produtos finais de glicosilação e ligações cruzadas do colágeno resultam em aumento da insolubilidade deste e mudanças das propriedades funcionais e conformacionais do tecido conjuntivo, causando danos na adesão de fatores de crescimento e nas células osteogênicas (células que dão origem aos ossos) e redução da força de resistência dos ossos, conduzindo a uma menor diferenciação e redução da resistência dos ossos a fraturas.



FONTE: BROWNLEE et al., 1986.

Figura 6 – Reações de glicosilação e formação de ligações cruzadas no colágeno.

2.8. Mecanismo de ação do aloxano na indução do diabetes melito

O aloxano, 2,4,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratado (MORDESS e ROSSINI, 1981), tem sido largamente utilizado como um agente diabetogênico desde a descoberta de sua relativa citotoxicidade para as células beta (β) do pâncreas (GORRAY et al., 1986).

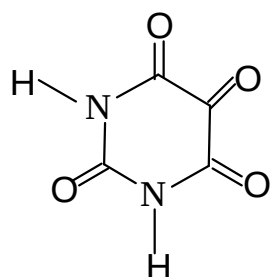
De acordo com GORRAY et al. (1986), estudos morfológicos sugerem que, na indução de diabetes melito por aloxano, as células β do pâncreas são destruídas por uma necrose de liquefação, o que resulta, após um período de aproximadamente cinco dias, em severa e persistente redução da insulina sérica; redução do número de células β no pâncreas e nas ilhotas; moderada cetonúria e perda de peso. Entretanto, GORRAY et al. (1986) verificaram que, em porquinhos-da-índia, as células β localizadas fora das ilhotas de Langerhans são resistentes ao efeito da droga.

Cerca de 10 minutos após uma injeção intravenosa de aloxano em cães, as células β das ilhotas do pâncreas encolhem, e o espaço capilar ao redor dessas células aumentam. Após 60 minutos, o núcleo das células β torna-se picnótico, e o citoplasma mostra vacuolização. Em cinco horas, a mitocôndria perde a aparência granular normal, apresentando edema e fragmentação, vindo a desaparecer completamente 12 horas após a injeção. Após 16 horas, ocorre lise do núcleo, culminando com a morte das células β . Neste período, as células alfa e delta mantêm sua aparência normal. Os ácinos permanecem intactos e a enzima de secreção pancreática, normal (PEMBERTON e MANAX, 1970).

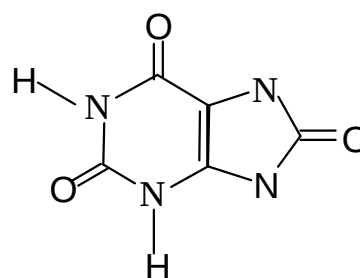
Segundo BONDY (1969), injeção intravenosa de aloxano causa rapidamente danos às células β das ilhotas. Se o fornecimento pancreático arterial for suspenso por cinco minutos após a injeção, as ilhotas são protegidas. O efeito imediato do aloxano é a elevação da glicose sangüínea, que pode ser prevenida por tratamento simultâneo com insulina ou por prévia adrenalectomia ou hipofisectomia. Entretanto, a prevenção da fase hiperglicêmica não previne os danos causados às células β . Brevemente, após o episódio hiperglicêmico, há

uma rápida queda da glicose do sangue para níveis hipoglicêmicos, provavelmente como um resultado da liberação da insulina pelas células β danificadas. Depois de poucos dias, a glicose do sangue volta a aumentar, passando a ser usualmente mantida em níveis elevados. Neste ponto, as células β estão degeneradas, sendo o conteúdo de insulina no pâncreas reduzido para níveis muito baixos.

A similaridade da estrutura do aloxano com a do ácido úrico indica a possibilidade de que a diabetes melito em humanos deve ocorrer como resultado de algum defeito no metabolismo do ácido úrico, que deve produzir aloxano em quantidades tóxicas. Não há, porém, evidências de que isso ocorra, já que métodos muito sensíveis têm falhado para detectar aloxano no sangue ou produzir evidências de que o ácido úrico seja convertido em aloxano *in vivo*. Entretanto, o ácido úrico é um produto final do metabolismo humano; e, em outras espécies que podem quebrar-se moléculas menores, os produtos finais são alantoína, amônia e ácido glioxílico. Em tampão borato, uricase (que está ausente em humanos) também forma ácido aloxânico, mas não existem evidências de que este composto chegue a se tornar aloxano.



Aloxano



Ácido úrico

O mecanismo de ação do aloxano em destruir células β não está claro, mas essa substância é também capaz de produzir danos no fígado e nos rins. Os danos nos rins são limitados às doses toleradas em muitos mamíferos, por isso o diabetes pode ser produzido somente em coelhos, ratos e cães. Em pássaros e anfíbios, a droga não produz a doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho experimental foi desenvolvido nos laboratórios do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisas Aplicadas – NIPA (DEQ/DBB), no laboratório de Eletroanalítica do Departamento de Química (DEQ) e no biotério do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS), da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Extração e purificação de antocianinas de *Tradescantia pallida*

3.1.1. Identificação botânica da espécie estudada

Folhas, caules e flores da espécie estudada foram colhidos no campus da Universidade Federal de Viçosa, secadas e prensadas no herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa e enviadas para o Laboratório de Botânica da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, onde foram identificadas pela pesquisadora Roxana Cardoso. A espécie foi identificada como *Setcreasea purpurea*, mas tem sido denominada atualmente *Tradescantia pallida*, sendo, portanto, os dois nomes aceitos.

3.1.2. Escolha do sistema de extração de antocianinas de *Tradescantia pallida*

Folhas de *Tradescantia pallida* colhidas em maio de 1996, no campus da Universidade Federal de Viçosa, foram lavadas em água corrente, picadas e secadas à sombra. Soluções de HCl 0,1%, em diferentes concentrações de etanol:água, foram testadas: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% de álcool etílico. A massa de folhas de *Tradescantia pallida* foi de 50 g para 100 mL de solvente extrator, volume de solvente que cobria completamente todo o material sólido. O período de extração foi de 12 horas, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente e sem agitação ou maceração. Após o período de extração, o extrato foi filtrado a vácuo. Em seguida retirou-se a clorofila, por extração líquido-líquido, com éter etílico, na proporção de 1:1.

O melhor sistema extrator foi determinado pela medida da absorvância no comprimento de onda de absorção máxima do extrato na região do visível. O comprimento de onda máximo foi determinado a partir de um espectro (270 a 600 nm) do extrato bruto de antocianinas de *Tradescantia pallida*. Para cada concentração de etanol foram feitas triplicatas. As leituras espectrofotométricas foram feitas em espectrofotômetro HITACHI, modelo: U-2000.

3.1.3. Determinação do tempo de extração de antocianinas de *Tradescantia pallida*

Após a determinação do melhor solvente extrator, avaliou-se o período de extração. Extratos antociânicos de folhas de *Tradescantia pallida* foram preparados como no item 3.1.2., usando-se solução de HCl 0,1% em etanol:água (40:60). Mediu-se a absorvância do extrato, em triplicata, no comprimento de máxima absorção no visível (541 nm), durante um período de 46 horas, com medidas espectrofotométricas de uma em uma hora.

3.1.4. Preparação do extrato antociânico de folhas de *Tradescantia pallida*

Extrato antociânico de folhas de *Tradescantia pallida*, colhidas em novembro de 1996, no campus da Universidade Federal de Viçosa, foi preparado como no item 3.1.2., usando-se solução de HCl 0,1% em etanol:água (40:60) e período de extração de 18 horas. O extrato foi concentrado por fluxo de ar até redução de 80% do seu volume. O extrato foi purgado com nitrogênio, para retirada do oxigênio, estocado a -18 °C, em freezer, ao abrigo da luz e utilizado à medida que foi necessário.

3.1.5. Purificação do extrato antociânico de *Tradescantia pallida*

3.1.5.1. Cromatografia em coluna de polivinilpolipirrolidona

O extrato bruto, preparado conforme os itens 3.1.2. e 3.1.4., foi purificado por cromatografia em coluna, tendo como suporte a polivinilpolipirrolidona – PVPP (Polyclar AT), preparada de acordo com WROLSTAD e STRUTHÉRS (1971). Foram usadas colunas de vidro, de 30 cm de altura x 2 cm de diâmetro, contendo PVPP até uma altura de 20 cm, onde se separaram 5 mL de extrato concentrado por vez. Usou-se, como eluente, água, seguida de uma solução de HCl 0,1% em metanol:água (70:30). A fração amarela, extraída com a água, foi descartada. A fração vermelha, característica de antocianinas, extraída com metanol:água (70:30), foi concentrada a 45 °C, em rotavapor, até total eliminação do metanol. Parte da água do extrato foi retirada por fluxo de ar. Foi feito um espectro de absorção na região de 270 a 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro HITACHI, modelo: U-2000.

3.1.5.2. Cromatografia em coluna com celulose

A fração do extrato antociânico, parcialmente purificado no item 3.1.5.1, foi cromatografada em uma coluna de vidro, de 30 cm de altura x 2 cm de

diâmetro, tendo como fase estacionária celulose microcristalina, até uma altura de 20 cm. Separou-se um volume de 5 mL de extrato antociânico concentrado. Foram utilizados como solventes HCl 1% e a fase superior da mistura butanol:ácido acético:água, na proporção de 4:1:5. As frações incolores e a primeira fração de cor rosa, extraída com HCl 0,1%, foram descartadas. As frações rosas, características de antocianinas, extraídas pela mistura butanol:ácido acético: água (4:1:5), foram reservadas.

Um espectro de varredura na região de 270 a 600 nm foi feito, utilizando-se espectrofotômetro HITACHI, modelo: U-2000.

3.2. Extratos antociânicos utilizados no ensaio biológico

3.2.1. Extrato antociânico de *Tradescantia pallida*

Extrato antociânico de folhas de *Tradescantia pallida*, colhidas entre abril e maio de 1997, no campus da Universidade Federal de Viçosa, foi preparado como no item 3.1.2., usando-se solução de HCl 0,1% em etanol:água (40:60) e período de extração de 18 horas. Utilizaram-se 6 kg de folhas de *Tradescantia pallida*, obtendo um volume final de 12 L de extrato. O extrato foi concentrado por fluxo de ar até redução de 80% do seu volume.

O extrato bruto foi parcialmente purificado por cromatografia em coluna, tendo como suporte a polivinilpolipirrolidona (Polyclar AT), preparada de acordo com WROLSTAD e STRUTHÉRS (1971). Usaram-se colunas de vidro de 50 cm de altura x 6 cm de diâmetro, com PVPP até uma altura de 30 cm. Foi utilizada como eluente a água, seguida de uma solução de HCl 0,1% em metanol:água (70:30). A fração amarela, extraída com a água, foi descartada. A fração vermelha, característica de antocianinas, extraída com metanol:água (70:30), foi concentrada a 45 °C, em rotavapor, até total eliminação do metanol. Parte da água do extrato foi retirada por fluxo de ar.

O volume final do extrato antociânico, parcialmente purificado em coluna de PVPP, após a concentração em rotavapor e concentração por fluxo de

ar, foi de 1.300 mL. O extrato antociânico de *Tradescantia pallida* foi purgado com gás nitrogênio para retirada do oxigênio e mantido em geladeira, ao abrigo da luz, durante os 21 dias de duração do ensaio biológico.

3.2.2. Determinação do peso seco do extrato antociânico

Três alíquotas de 1 mL do extrato aquoso de antocianinas de *Tradescantia pallida*, parcialmente purificado por cromatografia em coluna, usando-se polivinilpolipirrolidona como suporte (item 3.2.1.), e concentrado até um volume de 1.300 mL, foram evaporadas até à secura, e o seu peso seco foi determinado. Um volume de 6 mL, correspondente a 50 mg de peso seco do extrato aquoso de antocianinas de *Tradescantia pallida*, foi a dose diária administrada aos animais do ensaio biológico.

3.2.3. Extrato antociânico de uvas roxas

O extrato antociânico de uvas roxas é um corante em pó hidrossolúvel, utilizado na indústria de alimentos, o qual foi cedido pela indústria Christian Hansen. As quatro antocianidinas principais são peonidina, malvidina, delphinidina e petunidina. O corante é obtido a partir da extração aquosa de cascas de uvas. O extrato é concentrado por evaporação a vácuo, durante a qual impurezas são removidas. Em valores de pH abaixo de 5, esse corante fornece tonalidades que variam do rosa-claro ao vermelho-framboesa. Em valores de pH maiores, estas variam do vermelho-azulado ao azul.

Dados técnicos:

Força corante: 1.125 – 1.375 unidades/g

Contagem máxima de microorganismos:

Contagem total: 10.000 UFC/g

Coliformes fecais: ausente/g

Salmonella sp: ausente/25 g

Mofos e leveduras: 30 UFC/g

Legislação: isento de registro no Ministério da Saúde, conforme Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, Capítulo X, Artigos 57 e 58. Produto importado e vendido na embalagem comercial.

3.3. Avaliação do efeito de extratos antociânicos de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas em ratos diabéticos

Trinta ratos machos, albinos, da raça *Wistar*, procedentes do biotério do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, pesando entre 180 e 220 g, foram divididos em seis grupos, contendo cada grupo cinco animais. Estes foram colocados, individualmente, em gaiolas de arame sob ambiente com luz e temperatura controladas, ciclo escuro-claro de 12 horas, onde receberam ração comercial, NUVILAB CR1 da NUVITAL, moída, em quantidade controlada (15 g/dia) e água *ad libitum*. Os grupos de animais utilizados no modelo experimental foram os seguintes:

- Grupo 1: Testemunha – normal (N)

Ratos normais alimentados diariamente com 15 g de ração e água.

- Grupo 2: Controle - diabéticos (D)

Ratos diabéticos alimentados diariamente com 15 g de ração e água.

- Grupo 3: Uva - normal (UVA - N)

Ratos normais alimentados diariamente com 15 g de ração, à qual foram adicionados 50 mg de extrato antociânico de uvas roxas e água.

- Grupo 4: *Tradescantia pallida* - normal (T.P. - N)

Ratos normais alimentados diariamente com 15 g de ração, à qual foram adicionados 6 mL de extrato antociânico de *Tradescantia pallida* e água.

- Grupo 5: Uva – diabéticos (UVA - D)

Ratos diabéticos alimentados diariamente com ração 15 g de ração, à qual foram adicionados 50 mg de extrato antociânico de uvas roxas e água.

- Grupo 6: *Tradescantia pallida* - diabéticos (T.P. - D)

Ratos diabéticos alimentados diariamente com 15 g de ração, à qual foram adicionados 6 mL de extrato antociânico de *Tradescantia pallida* e água.

Foram adicionados 6 mL de extrato aquoso de antocianinas de *Tradescantia pallida* a 15 g de ração comercial, homogeneizados e secados ao ar 24 horas antes da alimentação dos animais. A ração, com extrato antociânico de *Tradescantia pallida*, era oferecida seca aos animais.

A glicemia sangüínea e o ganho de peso dos animais foram avaliados a cada sete dias, durante 21 dias. Ao final deste experimento também foram dosadas as proteínas colagenosas e não-colagenosas no tecido ósseo das patas traseiras e dianteiras dos ratos.

3.3.1. Indução do diabetes por injeção intravenosa de aloxano

Para a obtenção dos animais diabéticos, administraram-se, por via intravenosa, soluções da substância aloxano (2,4,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratado) em uma concentração de 60 mg/mL, tendo como veículo solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, perfazendo uma dose de 60 mg/kg de peso corporal.

A injeção do medicamento foi realizada, usando-se seringas de vidro centesimais, com agulhas hipodérmicas de 10 x 5. Para a realização deste processo, o animal foi contido em um imobilizador construído com tubo de PVC, tendo uma tampa fixa perfurada em uma das extremidades para a circulação do ar e, na extremidade oposta, outra tampa móvel perfurada no centro para passagem da cauda do animal, conforme Figura 7. Para facilitar a aplicação intravenosa do aloxano, a cauda foi imersa em água a uma temperatura de 40 - 45 °C, dilatando as veias. As veias utilizadas para a aplicação do aloxano foram as localizadas nas laterais da cauda, sendo administrado um volume máximo de 0,2 mL dessa solução.

Para a obtenção dos 15 animais diabéticos utilizados no experimento, foi necessário injetar aloxano em 80 ratos, sendo a eficiência do método de aproximadamente 20%.



Figura 7 – Imobilização dos animais para injeção do aloxano e retirada de sangue para medida da glicemia sangüínea.

Após a injeção do aloxano, esperou-se por um período de quatro dias para o desenvolvimento do diabetes. A dosagem sangüínea foi então realizada, retirando-se aproximadamente 20 μ L de sangue por incisão na cauda, os quais eram colocados em cada fita reativa (Glucotide), obtendo-se, por leitura direta no aparelho Glucometer 4 (Imomunoassay Produtos Hospitalares, Bayer Diagnóstica), o teor de glicose em mg/dL. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram um nível de glicose sangüínea superior a 125 mg/dL quando em jejum por 12 horas.

3.3.2. Avaliação da glicemia sangüínea e ganho de peso corporal

A avaliação dos efeitos causados pela administração de extratos antociânicos de uvas roxas e *Tradescantia pallida* em ratos diabéticos e normais foi feita mediante um modelo experimental com delineamento inteiramente

casualizado, em parcelas subdivididas, em que os grupos constituíram as parcelas e os tempos, as subparcelas, com cinco repetições.

O ensaio foi realizado durante o período de 21 dias, sendo a dosagem de glicose sangüínea realizada a cada sete dias, utilizando-se o aparelho Glucometer 4 da Bayer e a curva de peso corporal.

3.4. Determinação de proteínas do tecido ósseo

A avaliação dos efeitos causados pela administração de extratos antociânicos de uvas roxas e *Tradescantia pallida* no nível de proteínas colagenosas e não-colagenosas do tecido ósseo de ratos diabéticos foi feita mediante um modelo experimental com delineamento inteiramente casualizado, em que se consideraram seis grupos, já citados anteriormente, sendo cada um com cinco repetições.

Após serem sacrificados por inalação de éter, os animais dos grupos controle e tratados tiveram suas patas traseiras (fêmur e tíbia) e dianteiras (úmero, rádio e ulna) do lado direito retiradas. Os ossos das patas foram descarnados, extraindo-se, a seguir, as extremidades e a medula. Os ossos foram desidratados e desengordurados em soxhlet, durante 24 horas, utilizando-se éter etílico e éter de petróleo, respectivamente. Eles foram mantidos em dessecador até a análise das proteínas colagenosas e não-colagenosas.

3.4.1. Determinação de proteínas não-colagenosas pelo método de Bradford

Os ossos foram desmineralizados por 24 horas em sacos de diálise com solução de sal dissódico EDTA (etilenodiaminotetracético de sódio) 0,5 mol/L, pH 7,4, conforme HAUSCHKA et al., 1975. As proteínas não-colagenosas (PNC), cujos pesos moleculares são maiores que 10 kd, foram extraídas juntamente com os minerais pelo sal de sódio EDTA e quantificadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão e Coomassie Brilliant Blue G-250 como reagente de proteína. Os extratos foram

conservados em congelador. À alíquota de 500 µL do extrato protéico foram adicionados 5 mL do reagente Coomassie Blue, e, após três minutos de repouso, agitou-se a solução por inversão, sendo a absorvância a 595 nm medida em um espectrofotômetro HITACHI, modelo: U-2000.

3.4.2. Determinação de proteínas colagenosas pelo método de Berthelot

Para a quantificação das proteínas colagenosas (PC), os ossos moídos, desmineralizados e parcialmente desproteinizados, foram lavados exaustivamente com água deionizada para retirada do EDTA. Os ossos foram digeridos com ácido sulfúrico concentrado e seus teores de nitrogênio, determinados de acordo com o método de Berthelot, modificado por Przemek e Nielsen (FONTES, 1983) com base em FELKER (1977) e NKONGE e BALLANCE (1982). O teor de proteína foi calculado, usando-se o fator 6,25.

Foram pesados 10mg dos ossos desmineralizados com sal de EDTA. Adicionou-se uma pequena quantidade da mistura catalítica (200 g de sulfato de cobre (II), 20 g de sulfato de potássio e 2 g de selênio em pó) e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. O material foi digerido em bloco digestor a 400 °C até o clareamento da solução. As amostras foram diluídas para 10 mL, usando água destilada e deionizada.

À alíquota de 100 µL da amostra digerida adicionaram-se:

- 1) 7,9 mL de solução A: 0,9 mL de NaOH 3 mol/L; 0,1 mL de EDTA 0,027 mol/L, pH 10; 6,9 mL de água;
- 2) 1 mL de solução B: 1 g de fenol cristal, 5 mg de nitroprussiato de sódio em 100 mL de água deionizada;
- 3) 1 mL de solução C: 0,5 g de NaOH, 0,374 g de Na₂HPO₄.12H₂O, 3,18 g de Na₃PO₄.12H₂O, 2 mL de hipoclorito de sódio.

A amostra acrescida das soluções A, B e C foi deixada em repouso por duas horas para completo desenvolvimento da cor e, em seguida, agitada por inversão, sendo a absorvância a 630 nm medida em espectrofotômetro HITACHI, modelo: U-2000.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e purificação de antocianinas de *Tradescantia pallida*

4.1.1. Escolha do sistema extrator de antocianinas de *Tradescantia pallida*

Muitos sistemas de solventes têm sido usados para a extração de antocianinas de plantas, mas metanol acidificado com ácido clorídrico é o mais eficiente. Etanol acidificado é um pouco menos eficiente e pode ser mais apropriado para sistemas de alimentos, devido à toxidez do metanol (METIVIER et al., 1980). Deibner et al. (1965), citados por FULEKI e FRANCIS (1968), optaram pelo etanol como solvente extrator, pois este não é tóxico, é mais econômico e seu poder extrator é quase tão bom quanto o do metanol. A inclusão de água ajuda na extração de mais antocianinas hidrofílicas e permite a recuperação do etanol por destilação. O ácido clorídrico é utilizado para estabilizar o pigmento e abaixar o pH para níveis onde a absorvância das antocianinas está em seu máximo.

Em vista disso, optou-se por utilizar como solvente extrator o álcool etílico, acidificado com HCl 0,1%. Com base na necessidade de adição de água, para obtenção de uma melhor extração, determinou-se a proporção etanol:água ideal para a extração de antocianinas de *Tradescantia pallida*. A eficiência da

extração das antocianinas com a utilização de diferentes misturas etanol:água foi observada pela medida da absorvância das antocianinas no comprimento de onda de máxima absorção no visível.

Para a determinação do comprimento de onda de máxima absorção, realizou-se uma varredura dos extratos nas diferentes concentrações de etanol. O espectro UV-visível para o sistema etanol:água (40:60) é apresentado na Figura 8. O comprimento de onda de máxima absorção para a região do visível foi de 541 nm. As antocianinas também apresentam absorção na região do ultravioleta, entre 270 e 280 nm. Observou-se, também, um ombro na região de 320-330 nm, característico de antocianinas aciladas (IDAKA et al., 1987).

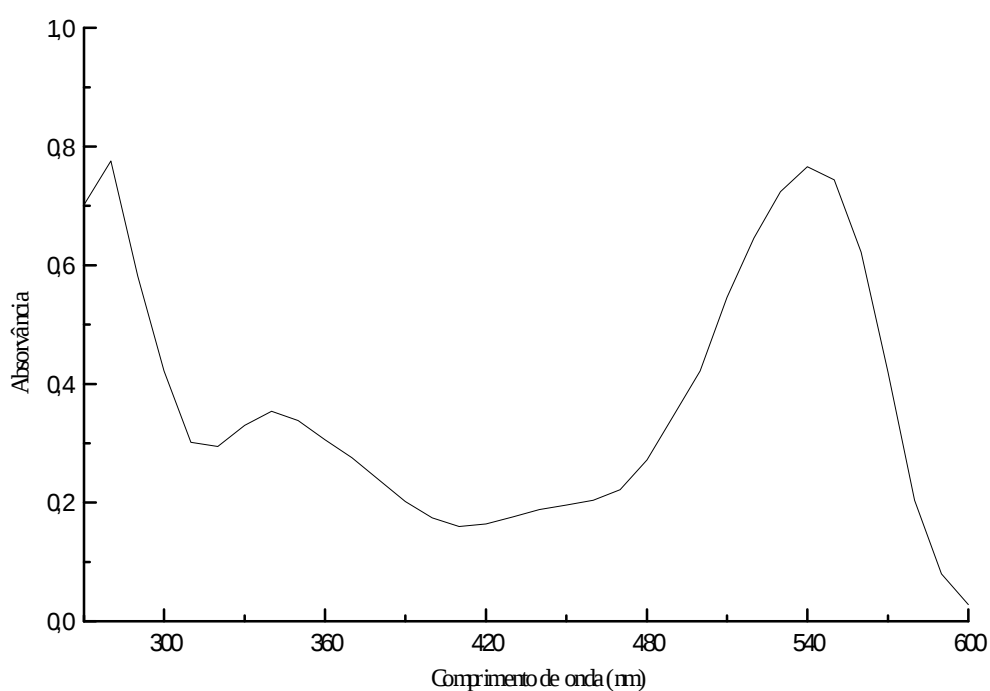


Figura 8 - Espectro de absorção UV-visível do extrato bruto de antocianinas de *Tradescantia pallida* no sistema HCl 0,1% em etanol:água (40:60).

Para a extração de antocianinas de *Tradescantia pallida*, dos sistemas etanol:água testados, a mistura etanol 70% apresentou o maior rendimento de extração, o que foi observado pela leitura das absorvâncias dos extratos no

comprimento de onda máximo de 541 nm, para diferentes proporções de etanol, como apresentado na Figura 9. Observou-se, no entanto, que maiores quantidades de clorofila eram extraídas em concentrações de etanol superiores a 60%.

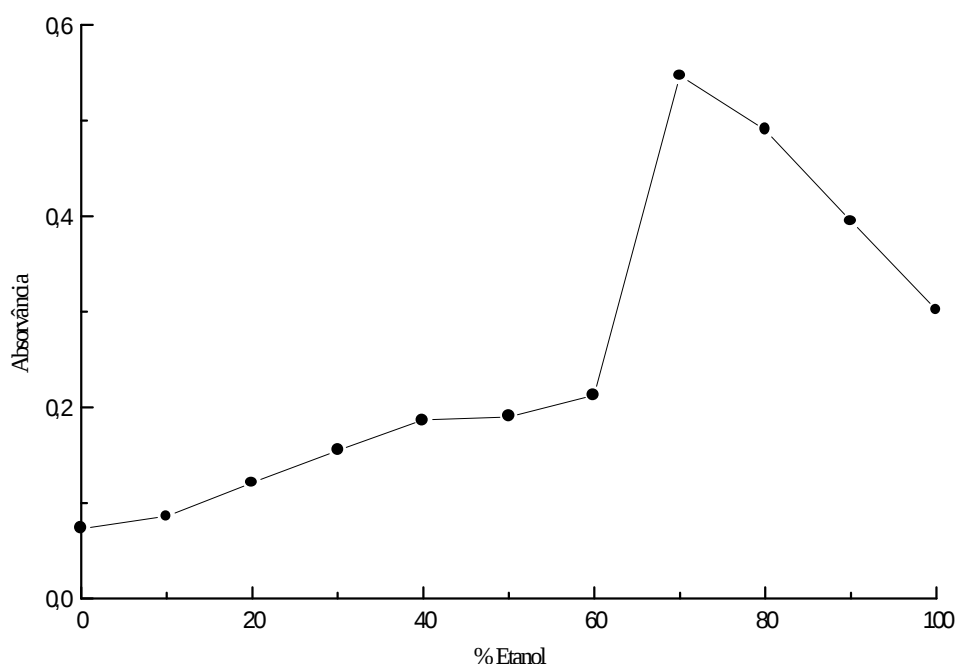


Figura 9 – Absorvância do extrato antociânico de *Tradescantia pallida* em razão da porcentagem de etanol no sistema extrator ($\lambda = 541$ nm).

FRANCIS (1982) recomenda a remoção de lipídeos e clorofila em extratos antociânicos, por extração líquido-líquido com éter de petróleo ou éter etílico. Para a remoção de clorofila do extrato antociânico de *Tradescantia pallida*, utilizou-se extração líquido-líquido com éter etílico, na proporção de 1:1. No entanto, a concentração de 70% de etanol em água dificultava a eliminação da clorofila, pois o etanol e o éter etílico se mostraram miscíveis nestas condições.

Devido às limitações expostas anteriormente para a remoção de clorofila, optou-se pelo sistema HCl 0,1% em etanol:água (40:60) como o solvente extrator de antocianinas de *Tradescantia pallida*, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

4.1.2. Determinação do tempo de extração de antocianinas de *Tradescantia pallida*

Uma vez estabelecidas as condições do sistema extrator, passou-se a investigar os melhores tempos de extração, que também foram avaliados pela intensidade de absorção a 541 nm. A Figura 10 apresenta as absorvâncias do extrato antociânico de *Tradescantia pallida* em diferentes tempos de extração, para o sistema HCl 0,1% em etanol:água (40:60). De acordo com a linha de tendência do gráfico da Figura 10, observa-se crescente aumento da absorvância até 46 horas. No entanto, 18 horas foi o tempo de extração escolhido, uma vez que após este período foi verificado aumento da extração de clorofila. O aumento da concentração de clorofila no extrato levaria à necessidade de duas extrações líquido-líquido com éter etílico, o que atrasaria e oneraria o processo, não resultando em grande otimização da extração de antocianinas.

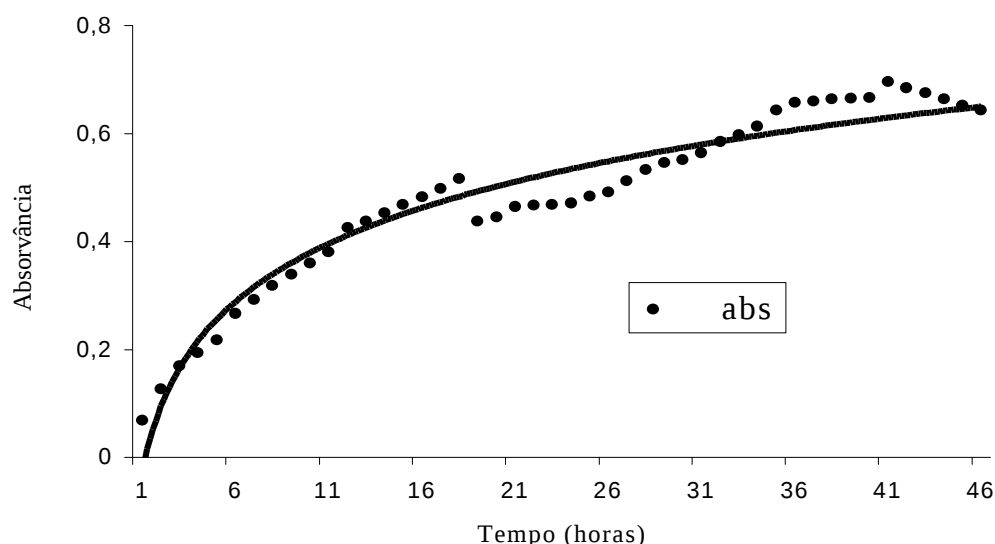


Figura 10 – Absorvância do extrato antociânico de *Tradescantia pallida* em razão do tempo de extração e da linha de tendência ajustada ($\lambda = 541$ nm).

4.1.3. Purificação do extrato antociânico de *Tradescantia pallida*

Os extratos obtidos de plantas normalmente apresentam vários pigmentos, além de misturas de antocianinas, e conseqüentemente sua separação e purificação são difíceis (WROLSTAD e STRUTHÉRS, 1971). Em trabalhos preparativos, STRACK e WRAY (1989) sugerem a utilização de cromatografia em papel ou camada delgada em celulose para a purificação de extratos antociânicos. Em trabalhos semipreparativos pode-se utilizar cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Estas técnicas são largamente empregadas, entretanto purificações em grande escala requerem cromatografia em coluna aberta. Devido à necessidade de se obter material suficiente para o ensaio biológico, optou-se pelo uso de cromatografia em coluna, graças à capacidade de purificação de maior quantidade do material por esta técnica em relação a cromatografia em placa ou papel.

De acordo com HRAZDINA (1970), cromatografia em coluna, usando polivinilpolipirrolidona (PVPP), tem-se mostrado eficiente na separação de grandes quantidades de antocianinas. Baseando nos trabalhos de HRAZDINA (1970) e outros pesquisadores (WROLSTAD e PUTNAM, 1969; WROLSTAD e STRUTHÉRS, 1971; STRINGHETA, 1992), optou-se pela utilização de PVPP como suporte para a cromatografia em coluna.

Para a purificação de antocianinas por cromatografia em coluna de PVPP, determinou-se, em ensaios preliminares, a utilização de água deionizada, seguida do sistema HCl 0,1% em metanol:água (70:30), como solventes extratores. STRINGHETA (1992), na purificação de antocianinas de inflorescência de capim-gordura, também utiliza o sistema metanol:água (70:30), acidificado com ácido clorídrico.

A adsorção e separação de antocianinas são baseadas na formação de ligações de hidrogênio entre os pigmentos e o material do suporte da coluna (PVPP). Os compostos fenólicos são adsorvidos em PVPP e outros compostos orgânicos, removidos por lavagem com água. O uso de solução aquosa de metanol como solvente na coluna de Polyclar AT destrói as ligações de

hidrogênio, e os pigmentos podem ser eluídos e fracionados (HRAZDINA, 1970). As frações eluídas em água deionizada, de cor amarela, foram desprezadas por conter outros compostos orgânicos e, não, antocianinas.

Como já mostrado na revisão bibliográfica, a antocianina de *Tradescantia pallida* é a 3,7,3'-triglicosil cianidina com três moléculas de ácido ferúlico e uma de glicose terminal. O outro pigmento é similar, mas sem a glicose terminal (SHI et al., 1993). Considerou-se que o extrato de antocianinas de *Tradescantia pallida* conteria, como principal aglicona, a cianidina. Assim, após a eluição da fração amarela e das primeiras frações rosa-pálidas contendo antocianinas, todas as frações eluídas em metanol:água (70:30) acidificado com HCl 0,1% foram consideradas uma só. Esta fração foi denominada F, cujo espectro de absorção UV-visível é apresentado na Figura 11.

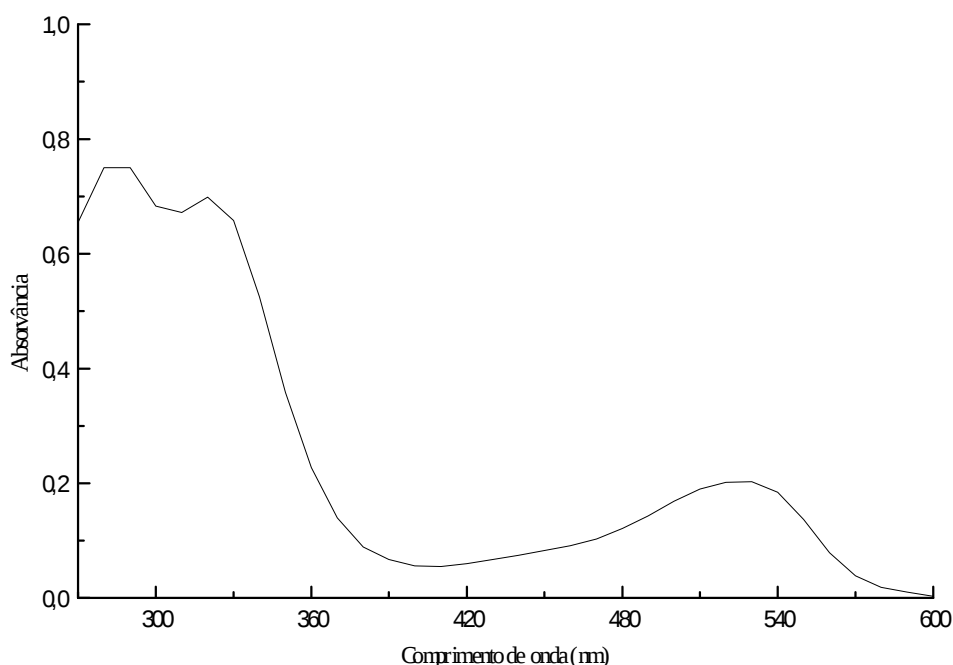


Figura 11 – Espectro de absorção UV-visível da fração F, fase metanol:água (70:30), do extrato de antocianinas de *Tradescantia pallida* purificado em coluna de PVPP.

A fração F, quando cromatografada em papel Whatman nº 3 com HCl 1% como fase móvel, apresentou uma única zona de cor rosa. Entretanto, quando foi observado o cromatograma sob luz ultravioleta, verificou-se que a zona de cor rosa se localizava abaixo de uma zona que absorvia no ultravioleta. Quando submetida a vapores de amônia, a zona rosa tornou-se azul, coloração de antocianinas em pH alcalino, e a zona antes só observada sob luz ultravioleta apresentou uma cor amarela, característica de compostos flavonoídicos. Este fato indicou que alguns flavonóides presentes no extrato antociânico de *Tradescantia pallida* não se separaram das antocianinas por cromatografia em coluna de PVPP. Esta separação poderia ser obtida por cromatografia em papel, mas, em virtude do baixo rendimento da purificação por cromatografia em papel e da grande quantidade de extrato necessária para o ensaio biológico, esta técnica mostrou-se inviável.

Devido à inviabilidade de obtenção de quantidade suficiente de extrato por cromatografia em papel, optou-se por realizar a purificação em cromatografia em coluna, usando celulose microcristalina. Com base na técnica de cromatografia em papel e no trabalho de TANCHEV e TIMBERLAKE (1969), foram empregados, como fases móveis, HCl 1% e o sistema butanol:ácido acético:água (BAW), na proporção de 4:1:5. O extrato de antocianinas, parcialmente purificado por cromatografia em coluna de PVPP, foi passado através da coluna de celulose. As frações eluídas em HCl 1% foram descartadas por ser amareladas e conter flavonóides não antociânicos. A presença destes flavonóides foi confirmada, cromatografando-se esta fração em papel e observando-a sob luz ultravioleta. Após a eluição de uma fração rosa-clara em BAW, consideraram-se todas as outras frações como uma só, a qual foi denominada F2. Cromatografou-se a fração F2 em papel Whatman nº 3, usando como fase móvel HCl 1%. Não observou-se absorção sob luz ultravioleta.

O espectro de absorção UV-visível da fração F2 está indicado na Figura 12. Comparando o espectro da Figura 11 com o da Figura 12, observa-se uma diminuição da absorvância nos comprimentos de onda entre 350 e 380 nm, faixa característica de compostos flavonóides não antociânicos.

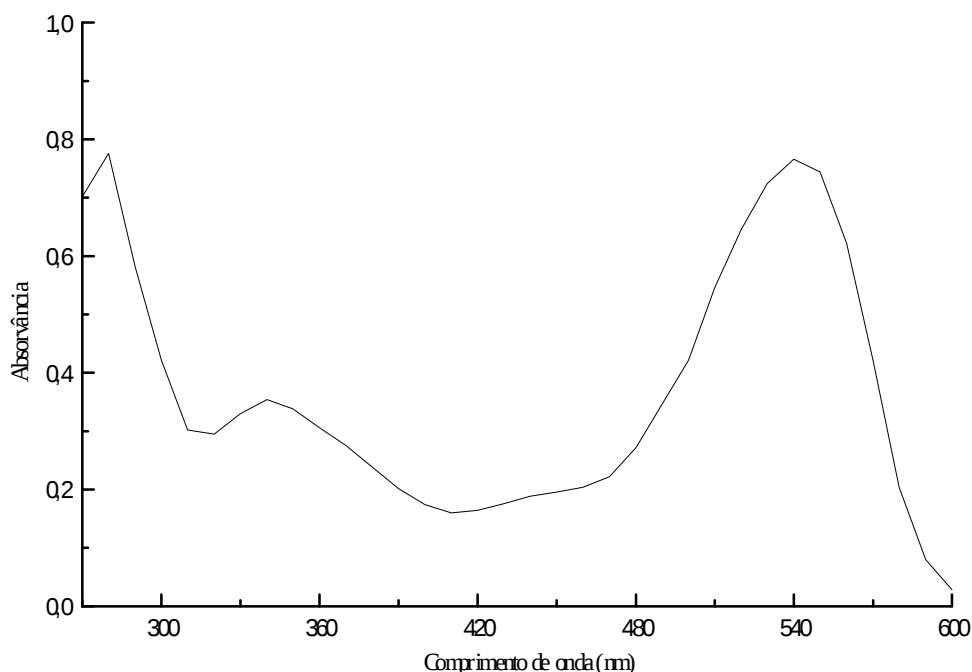


Figura 12 – Espectro de absorção UV-visível da fração F2 do extrato de antocianinas de *Tradescantia pallida* purificado em coluna de celulose microcristalina.

4.2. Extrato antociânico de *Tradescantia pallida* utilizado no ensaio biológico

O extrato antociânico de *Tradescantia pallida* utilizado no ensaio biológico só foi purificado em coluna de polivinilpolipirrolidona (PVPP). A purificação em coluna com celulose microcristalina, usando-se os solventes HCl 1% e o sistema butanol:ácido acético:água, não pôde ser realizada devido à dificuldade em se retirar o butanol do extrato. O uso de altas temperaturas poderia provocar a decomposição do extrato antociânico.

4.2.1. Determinação do peso seco

Em razão da dificuldade de se obter o extrato antociânico de *Tradescantia pallida* na forma de pó, optou-se por misturá-lo à ração na forma líquida. Para se determinar a quantidade de massa seca presente em 1 mL de extrato aquoso de antocianinas, acidificado com HCl, purificado por

cromatografia em coluna de PVPP e concentrado até um volume de 1.300 mL, triplicatas de 1 mL do extrato foram evaporadas até a secura. Cada mL forneceu um peso seco médio de 8,3 mg. Um volume de 6 mL, correspondente a aproximadamente 50 mg de peso seco do extrato antociânico de *Tradescantia pallida*, foi a dose diária administrada aos animais do ensaio biológico.

4.3. Indução do diabetes por injeção intravenosa de aloxano

Para a obtenção dos animais diabéticos, administrou-se, por via intravenosa, solução da substância aloxano (2,4,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratado) em uma concentração de 60 mg/mL, tendo como veículo solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, perfazendo uma dose de 60 mg/kg de peso corporal.

CHAUHAN et al. (1979) induziram diabetes, experimentalmente, em fêmeas de ratos albinos, administrando aloxano monoidratado, em uma dose de 60 mg/kg de peso, por injeção intravenosa. BEHERA e PATNAIK (1979) induziram diabetes, experimentalmente, em ratos Swiss, utilizando uma dose de aloxano de 100 mg/kg de peso. MOHANAM e BOSE (1981) induziram diabetes em ratos albinos machos por injeção intraperitoneal de aloxano em NaCl 0,9%, em uma dose de 100 mg/100g de peso corporal. MARCIANO (1997) testou diferentes concentrações de aloxano para induzir diabetes experimental em ratos albinos, da raça *Wistar*. Ratos que receberam doses de 80 e 120 mg/kg por via intravenosa apresentaram alto índice de mortalidade. Com a dose de 40 mg/kg não obteve-se grande número de animais diabéticos. MARCIANO (1997) considerou a dose de 60 mg de aloxano/kg de peso corporal ideal para a indução de diabetes experimental em ratos machos, albinos, da raça *Wistar*.

Após a administração de aloxano, esperou-se um período de quatro dias para o desenvolvimento do diabetes. De acordo com BONDY (1969), imediatamente após a injeção do aloxano há uma elevação da glicose sangüínea. Após o episódio hiperglicêmico ocorre rápida queda da glicose do sangue para níveis hipoglicêmicos, provavelmente como resultado da liberação de insulina

pelas células beta danificadas. Após alguns dias, a glicose do sangue volta a aumentar após o que é usualmente mantida em níveis elevados. MARCIANO (1997) aguardou um período de cinco dias para o desenvolvimento do diabetes.

Após quatro dias de aplicação de aloxano foi medida a glicose sangüínea dos animais em jejum e incluíram-se nos grupos de ratos diabéticos aqueles que alcançaram níveis de glicose superiores a 125 mg/dL. Ratos normais apresentam glicose sangüínea entre 70 e 90 mg/dL (BERENSON, 1972; BEHERA e PATNAIK, 1979; MOHANAM e BOSE, 1981;). MARCIANO (1997) considerou diabéticos os ratos que apresentaram aumento de 30 mg/dL na glicose sangüínea em relação ao grupo controle, quatro dias após terem recebido uma dose de aloxano de 60 mg/kg de peso corporal. YEP et al. (1972) consideraram diabéticos os ratos que apresentaram acentuada glicosúria ($> 0,5\%$) e perda de peso corporal após administração de uma dose de aloxano de 120 mg/kg de peso. BEHERA e PATNAIK (1979), utilizando aloxano em uma dose de 100 mg/kg, obtiveram, após 96 horas, ratos diabéticos com glicose sangüínea em torno de 152 mg/dL. BERENSON et al. (1972) consideraram diabéticos os ratos que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dL quando o diabetes foi induzido com a aplicação de uma dose de 50 mg/kg de estreptozotocina.

Para a obtenção dos 15 animais com glicose sangüínea superior a 125 mg/dL, foi necessário injetar aloxano em 80 ratos, sendo a eficiência do método de aproximadamente 20%. O Quadro 4 apresenta os valores de glicemia sangüínea dos 15 ratos utilizados no experimento, antes e após a injeção de aloxano. Os valores da glicemia sangüínea dos 80 ratos, que receberam aloxano, são apresentados no Quadro 1A, do Apêndice.

Os 15 animais considerados diabéticos foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos do ensaio experimental: Controle - ratos diabéticos não-tratados; UVA (D) – ratos diabéticos tratados com antocianinas de uvas roxas; e T.P. (D) – ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida*. Cada grupo continha cinco animais.

Quadro 4 – Valores de glicemia sangüínea (mg/dL) dos ratos antes e depois da injeção intravenosa de aloxano

Rato	Glicemia (mg/dL)		
	Inicial	Após aloxano	Alteração
1	67,0	235,0	+ 165,0
2	83,0	128,0	+ 45,0
3	68,0	222,0	+ 154,0
4	89,0	165,0	+ 76,0
5	85,0	143,0	+ 58,0
6	88,0	386,0	+ 298,0
7	77,0	173,0	+ 96,0
8	83,0	301,0	+ 218,0
9	79,0	336,0	+ 257,0
10	94,0	249,0	+ 155,0
11	89,0	353,0	+ 264,0
12	91,0	206,0	+ 115,0
13	83,0	328 0	+ 245,0
14	90,0	291,0	+ 201,0
15	86,0	305,0	+ 219,0

4.4. Efeito das antocianinas no nível de glicose sangüínea

A avaliação do efeito do extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) no nível de glicose sangüínea foi feita mediante um modelo experimental, utilizando-se ratos albinos *Wistar* normais e com diabetes induzido por aloxano. O período de avaliação foi de 21 dias, sendo a glicose sangüínea medida a cada sete dias. O modelo experimental, com delineamento inteiramente casualizado, continha parcelas subdivididas, em que os grupos constituíram as parcelas e os tempos, as subparcelas, com cinco repetições.

O Quadro 5 apresenta os valores médios $\pm$ erros-padrão das taxas de glicose sangüínea dos seis grupos de ratos utilizados no experimento.

Quadro 5 – Valores médios $\pm$ erros-padrão do nível de glicose sangüínea (mg/dL) dos grupos de ratos normais (N) e diabéticos (D) tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA) e antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T) e Controle (C)

Grupos		Glicose sangüínea (mg/dL)			
		Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
T	(N)	72,0 $\pm$ 3,0 A	75,0 $\pm$ 6,3 A	80,6 $\pm$ 6,0 A	82,0 $\pm$ 6,7 A
C	(D)	252,2 $\pm$ 24,2 a	219,2 $\pm$ 35,5 a	307,4 $\pm$ 27,2 a	296,2 $\pm$ 30,4 a
UVA	(N)	77,2 $\pm$ 1,6 Ab	85,8 $\pm$ 3,9 Ab	84,6 $\pm$ 2,9 Ab	77,4 $\pm$ 4,0 Ab
T.P.	(N)	75,6 $\pm$ 0,8 Ab	81,8 $\pm$ 4,2 Ab	76,2 $\pm$ 3,8 Ab	87,2 $\pm$ 3,1 Ab
UVA	(D)	226,2 $\pm$ 44,1 Ba	221,8 $\pm$ 23,4 Ba	148,8 $\pm$ 8,2 Ab	262,8 $\pm$ 66,8 Ba
T.P.	(D)	283,0 $\pm$ 29,8 Ba	246,0 $\pm$ 44,0 Ba	267,6 $\pm$ 51,3 Ba	344,6 $\pm$ 22,4 Ba

Em cada tempo de avaliação (coluna), médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula não diferem, respectivamente, da Testemunha e do Controle, pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

O diabetes melito é definido por PALLARDO (1997) como uma síndrome caracterizada por níveis elevados de glicose sangüínea. Como visto no item 4.3., os ratos diabéticos deste experimento foram obtidos por aplicação

intravenosa da droga aloxano, o que foi constatado pelo aumento dos níveis de glicose sangüínea em relação aos ratos normais.

As antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* não provocaram alteração dos níveis de glicose nos ratos normais e diabéticos. Assim, os valores de glicemia sangüínea dos animais normais tratados com antocianinas não diferiram significativamente dos do grupo Testemunha (ratos normais não-tratados) nos quatro tempos de avaliação.

De acordo com o Quadro 5, os níveis de glicose sangüínea dos ratos do grupo Controle diferiram significativamente dos dos ratos normais tratados com antocianinas de uvas e de *Tradescantia pallida*, com exceção do 14^o dia. Neste dia, o nível de glicose sangüínea dos ratos diabéticos, tratados com antocianinas de uvas, sofreu uma redução de 73 mg/dL em relação ao sétimo dia.

A Figura 13 mostra o nível de glicose sangüínea de ratos diabéticos (D) e normais (N) em diferentes tempos de avaliação, isto é, tratados com extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) e não-tratados, Testemunha (T – N) e Controle (C – D).

Observa-se na Figura 13 que praticamente não houve variação da glicemia sangüínea, no grupo Testemunha, no grupo de ratos normais tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA – N) e no grupo de ratos normais tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P. – N), nos quatro tempos de avaliação.

Os níveis de glicose sangüínea dos grupos de ratos diabéticos, tratados ou não com antocianinas, sofreram oscilações durante o período de avaliação. Apesar das oscilações, os três grupos de ratos diabéticos, Controle – D, UVA – D e T.P. – D, apresentaram, no 21^o dia, níveis de glicose sangüínea superiores aos do início do tratamento (Dia 0). O grupo Controle apresentou aumento de 44,6 mg/dL no nível de glicose ao final do período de avaliação. Os grupos de ratos diabéticos, tratados com antocianinas de uvas roxas e antocianinas de *Tradescantia pallida*, tiveram aumento de 36,6 e 61,4 mg/dL no nível de glicose, respectivamente, ao final do período de 21 dias de avaliação. O aumento do nível de glicose do grupo Controle, que não recebeu nenhum tratamento, indica que o

aumento final dos níveis de glicose dos ratos tratados não foi devido às antocianinas.

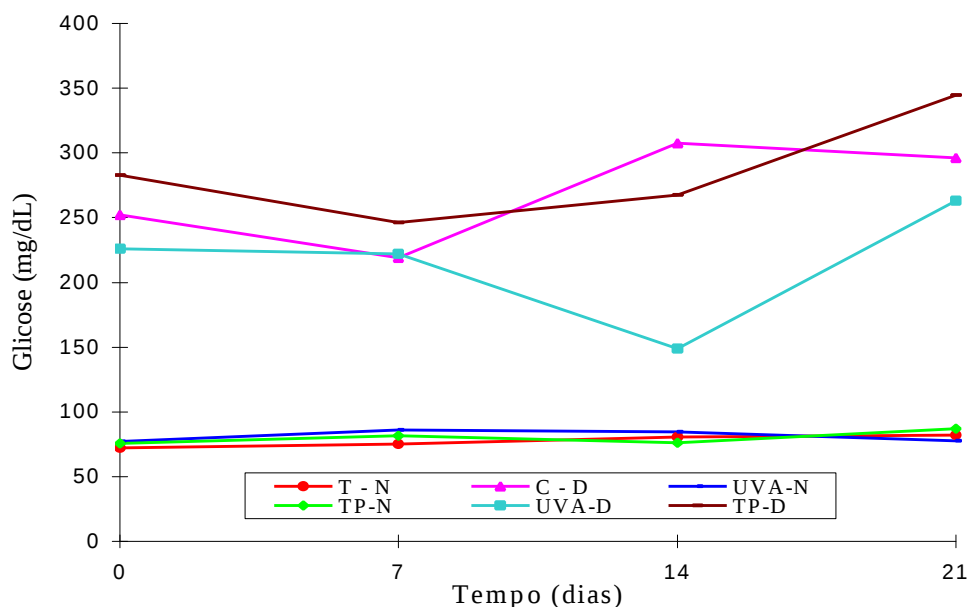


Figura 13 – Nível de glicose sangüínea (mg/dL), em diferentes tempos de avaliação, de ratos diabéticos (D) e normais (N) tratados com extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T – N) e Controle (C – D).

VERTOMMEN et al. (1994), estudando os efeitos do flavonóide diosmina em fêmeas de ratos *Wistar* com diabetes induzido por estreptozotocina, não observaram nenhuma alteração no nível de glicose sangüínea. Tratamentos com o flavonóide rutina também não modificaram os níveis de glicose sangüínea de ratos diabéticos, conforme estudos realizados por ODETTI et al. (1990). POURRAT et al. (1967) não observaram nenhum efeito hipoglicemiante quando antocianinas foram administradas em coelhos. Os resultados obtidos por esses autores concordam com os encontrados neste trabalho, em que não se observou efeito hipoglicemiante de antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* em ratos normais e diabéticos.

O resumo das análises de variância do nível de glicose sangüínea, apresentado no Quadro 6, indica ter havido diferença significativa, a 1% de probabilidade, entre os seis grupos de ratos do modelo experimental (Grupo). Houve também diferença significativa, a 5% de probabilidade, entre os tempos de avaliação do nível de glicose sangüínea (Tempo). Entretanto, não foi possível ajustar equações de regressão para a avaliação da glicemia sangüínea no decorrer do período em razão aos baixos valores encontrados para os coeficientes de determinação (R^2). A interação entre os seis grupos de ratos e o tempo de avaliação da glicemia (G x t) não foi significativa.

Quadro 6 – Resumo das análises de variância do nível de glicose sangüínea de seis grupos de ratos avaliados no período de 21 dias

FV	GL	Quadrados médios
Grupo (G)	5	198208,90 **
Resíduo A	24	6655,60
Tempo (t)	3	7965,09 *
G x t	15	4211,35 ns
Resíduo B	72	2422,54
CV parcela (%)		48,57
CV subparcela (%)		29,30

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo.

O Quadro 7 apresenta o desdobramento dos seis grupos de ratos dentro de cada tempo de avaliação do nível de glicose sangüínea. Os resultados indicam ter ocorrido diferença significativa, a 1% de probabilidade, entre o estado (E), normal e diabético, em todos os quatro tempos de avaliação da glicemia. Entretanto, só houve efeito significativo do tratamento (Tr) no 14^o e 21^o dias.

A interação estado x tratamento (E x Tr) só foi significativa, a 1% de probabilidade, no 14^o dia. Neste dia, houve redução de 73 mg/dL no nível de

glicose sangüínea, em relação ao dia 0, nos grupos de ratos diabéticos tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA – D).

Como apresentado no Quadro 7, a glicemia do grupo Controle diferiu significativamente, a 1% de probabilidade, da glicemia do grupo Testemunha em todos os quatro tempos de avaliação. Esta diferença comprova a eficiência do aloxano em induzir o diabetes melito e, conseqüentemente, aumentar o nível de glicose sangüínea.

Quadro 7 – Desdobramento dos grupos de ratos dentro de cada tempo, para a glicose sangüínea

FV	GL	Quadrados médios			
		Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Grupo 1	5	49621,08 **	33411,74 **	52437,43 **	75372,68 **
Fatorial (F)	(3)	55616,07 **	38051,37 **	39041,40 **	87352,67 **
Estado (E)	1	158776,20 **	112650,00 **	81664,21 **	245089,80 **
Tratamento (Tr)	1	3808,80 ns	510,05 ns	15235,20 *	10488,20 **
E x Tr	1	4263,20 ns	994,05 ns	20224,80 **	6480,00 ns
Controle (C)	1	81180,13 **	51984,12 **	128595,60 **	114704,10 **
F vs C	1	77,07 ns	920,48 ns	16467,34 *	101,40 ns
Resíduo comb.	75	2784,64	2784,64	2784,64	2784,64

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo.

A comparação dos efeitos das antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* no nível de glicose sangüínea, nos quatro tempos de avaliação, é apresentada no Quadro 8.

Para os ratos normais, o nível de glicose sangüínea dos grupos tratados com antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* não diferiu significativamente, pelo teste F, em nenhum dos quatro tempos de avaliação. Os tratamentos com antocianinas de uvas ou de *Tradescantia pallida* não

apresentaram nenhuma tendência constante no aumento ou na diminuição da glicemia sangüínea. Os valores de glicose sangüínea mantiveram-se no nível médio dos ratos normais (70 – 90 mg/dL) não-tratados com antocianinas, grupo Testemunha.

No caso dos ratos diabéticos, os níveis de glicose sangüínea dos grupos tratados com antocianinas de uvas e de *Tradescantia pallida* diferiram significativamente no 14^o e no 21^o dia quando o nível de glicose sangüínea dos ratos tratados com antocianinas de uvas apresentaram redução significativa em relação ao grupo de ratos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida*. Apesar de a diferença não ter sido significativa, em todos os quatro tempos de avaliação, os níveis de glicose sangüínea dos ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* foram maiores que os dos ratos tratados com antocianinas de uvas.

Quadro 8 – Comparação de ratos diabéticos e normais e de antocianinas de uvas roxas (UVA) e de *Tradescantia pallida* (T.P.) para o nível de glicose sangüínea em diferentes tempos de avaliação

Período	Tratamento	Glicose sanguínea (mg/dL)	
		Normais	Diabéticos
Dia 0			
	Controles	72,0	252,2
	UVA	77,2 Ba	226,2 Aa
	T.P.	75,6 Ba	283,0 Aa
7º dia			
	Controles	75,0	219,2
	UVA	85,8 Ba	221,8 Aa
	T.P.	81,8 Ba	246,0 Aa
14 º dia			
	Controles	80,6	307,4
	UVA	84,6 Ba	148,8 Ab
	T.P.	76,2 Ba	267,6 Aa
21º dia			
	Controles	82,0	296,2
	UVA	77,4 Ba	262,8 Ab
	T.P.	87,2 Ba	344,6 Aa

Controles: normais (Testemunha) e diabéticos (Controle).

Em cada período e em cada linha, A > B pelo teste F.

Em cada período e em cada coluna, a > b pelo teste F.

4.5. Efeito das antocianinas no peso corporal

O efeito do extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) na variação de peso foi avaliado por meio de um modelo experimental, utilizando-se ratos albinos *Wistar* normais e com diabetes induzido por aloxano. O período de avaliação foi de 21 dias sendo o peso medido a cada sete dias. O modelo experimental, com delineamento inteiramente casualizado, continha parcelas subdivididas, em que os grupos constituíram as parcelas e os tempos, as subparcelas, com cinco repetições.

Os ratos utilizados no ensaio biológico apresentavam inicialmente peso entre 180 e 220 g. Os animais separados, aleatoriamente, para indução do diabetes apresentaram considerável perda de peso no intervalo de quatro dias, necessários para o desenvolvimento da doença. O peso médio dos ratos diabéticos sofreu redução de cerca de 16%, estabelecendo-se entre 160 e 200 g. O Quadro 9 apresenta os pesos iniciais e após quatro dias de aplicação do aloxano, assim como as alterações nos pesos dos ratos diabéticos.

De acordo com ARDUÍNO (1979), no diabetes melito não controlado o emagrecimento figura entre as manifestações mais comuns, sendo decorrente principalmente do catabolismo das proteínas e da gordura do tecido adiposo, da perda de glicose pela urina, que pode alcançar cifras de 10% com o correspondente desperdício calórico, e da desidratação decorrente da poliúria.

Quadro 9 – Pesos (g) iniciais e após a indução do diabetes por injeção intravenosa de aloxano dos ratos diabéticos utilizados no ensaio biológico

Rato	Peso (g)		
	Inicial	Após aloxano	Alteração
1	186,0	139,0	- 47,0
2	196,0	145,0	- 51,0
3	184,0	168,0	- 16,0
4	180,0	144,0	- 36,0
5	180,0	156,0	- 24,0
6	211,0	165,0	- 46,0
7	220,0	204,0	- 16,0
8	220,0	185,0	- 35,0
9	202,0	165,0	- 37,0
10	201,0	159,0	- 42,0
11	180,0	156,0	- 24,0
12	187,0	156,0	- 31,0
13	189,0	152,0	- 37,0
14	208,0	186,0	- 22,0
15	207,0	197,0	- 10,0

O Quadro 10 apresenta os valores médios $\pm$ erros-padrão do peso dos ratos dos grupos utilizados no experimento.

Quadro 10 – Valores médios $\pm$ erros-padrão do peso (g) dos grupos de ratos normais (N) e diabéticos (D) tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA) e antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T) e Controle (C)

Grupos		Peso corporal (g)			
		Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
T	(N)	206,2 $\pm$ 5,7 A	224,0 $\pm$ 5,4 A	243,0 $\pm$ 5,0 A	251,8 $\pm$ 4,5 A
C	(D)	156,0 $\pm$ 5,2 a	158,2 $\pm$ 7,0 a	178,2 $\pm$ 11,0 a	191,8 $\pm$ 13,7 a
UVA	(N)	204,0 $\pm$ 4,5 Ab	218,4 $\pm$ 7,0 Ab	235,8 $\pm$ 6,5 Ab	244,6 $\pm$ 5,2 Ab
T.P.	(N)	203,2 $\pm$ 8,1 Ab	213,6 $\pm$ 9,2 Ab	223,6 $\pm$ 8,2 Ab	243,0 $\pm$ 8,1 Ab
UV	(D)	156,0 $\pm$ 4,1 Ba	157,8 $\pm$ 6,9 Ba	162,0 $\pm$ 9,8 Ba	172,0 $\pm$ 12,7 Ba
T.P.	(D)	185,6 $\pm$ 8,2 Ba	160,2 $\pm$ 7,9 Ba	160,8 $\pm$ 7,2 Ba	155,6 $\pm$ 7,1 Bb

Em cada coluna, médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula não diferem, respectivamente, da Testemunha e do Controle, pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

De acordo com os valores médios, apresentados no quadro anterior, o peso médio do grupo Testemunha (T – N), ratos normais não-tratados, não diferiu significativamente, pelo teste de Dunnett, dos ratos normais tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA – N) e antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P. – N), nos quatro tempos de avaliação.

Os ratos diabéticos tratados com antocianinas não diferiram dos do grupo Controle, exceto no 21^o dia, quando o peso do grupo de ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* diminuiu em relação ao grupo Controle.

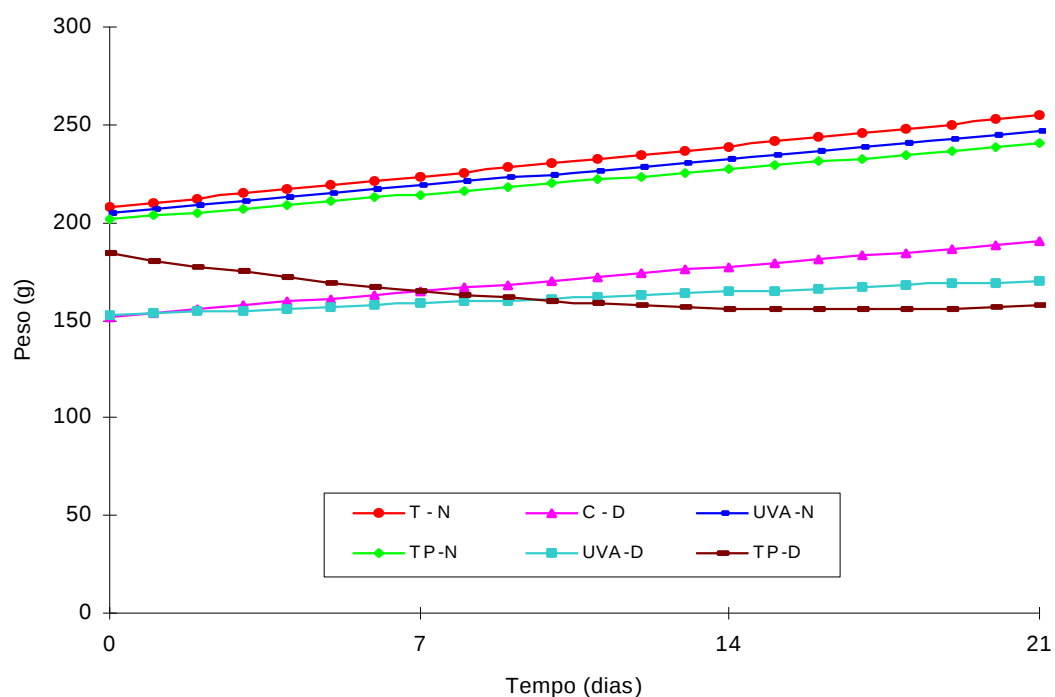
A diferença de peso apresentada entre os grupos de ratos normais e diabéticos, respectivamente, em relação aos grupos Controle e Testemunha, no início do tratamento (Dia 0), está relacionada à perda de peso dos ratos diabéticos no período de quatro dias, necessário para o desenvolvimento do diabetes.

A Figura 14 relaciona o peso de ratos diabéticos (D) e normais (N), em diferentes tempos de avaliação, tratados com extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T – N) e Controle (C – D).

De acordo com a Figura 14 e com os valores das equações das retas, pode-se observar aumento diário de aproximadamente 2,2 g no peso corporal dos ratos do grupo Testemunha (T – N). Os grupos Controle (C – D), UVA – N e T.P. – N apresentaram ganho de peso de cerca de 1,8 g por dia. Os ratos do grupo UVA – D apresentaram ganho de peso menos pronunciado, 0,84 g/dia. Os grupos citados anteriormente apresentaram ganho linear de peso. VERTOMMEN et al. (1994), em um trabalho em que se trataram ratos com diabetes, induzido por estreptozotocina, com o flavonóide diosmina, observaram ganho de peso maior que nos ratos diabéticos não-tratados, porém menor que nos ratos normais. Grupos de ratos diabéticos tratados com o flavonóide rutina, bem como os grupos não-tratados, apresentaram baixo ganho de peso, durante o estudo, quando comparado com o controle não-diabético (ODETTI et al., 1990).

Já os ratos diabéticos, tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P. – D), apresentaram perda de peso de aproximadamente 3,44 g/dia, representada, na Figura 14, por uma equação quadrática, embora eles tenham consumido a mesma quantidade de ração que os outros grupos do experimento. O desdobramento da interação grupo x tempo (G x t), para o peso, dos seis grupos de ratos está apresentado no Quadro 1B, do Apêndice.

A perda de peso apresentada pelo grupo de ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* não deve ser atribuída a estes pigmentos, já que os animais normais tratados com eles não perderam peso.



Testemunha (T – N)	$Y = 207,8880 + 2,2257 \text{ t}^{**}$	$r^2 = 0,98$
Controle (C – D)	$Y = 151,9400 + 1,8200 \text{ t}^{**}$	$r^2 = 0,93$
UVA – N	$Y = 204,8200 + 1,9886 \text{ t}^{**}$	$r^2 = 0,99$
T.P. – N	$Y = 201,4400 + 1,8486 \text{ t}^{**}$	$r^2 = 0,97$
UVA – D	$Y = 152,5800 + 0,8400 \text{ t}^{**}$	$r^2 = 0,94$
T.P. – D	$Y = 184,0100 - 3,4414 \text{ t}^{**} + 0,1031 \text{ t}^{2*}$	$R^2 = 0,91$

** e * Significativo a 1 e 5%, respectivamente, pelo teste F.

Figura 14 – Estimativa do peso, em diferentes períodos de avaliação, de ratos diabéticos (D) e normais (N) tratados com extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T – N) e Controle (C – D).

O Quadro 11 apresenta o resumo das análises de variância. De acordo com estas análises, observa-se diferença significativa, a 1% de probabilidade, entre os pesos dos seis grupos de ratos do modelo experimental (Grupo). Houve também diferença significativa, a 1% de probabilidade, entre os tempos de avaliação do peso corporal (Tempo) e entre a interação dos seis grupos e o tempo de avaliação dos pesos (G x t). Esta diferença foi apresentada na forma de equações de regressão na Figura 14.

Quadro 11 – Resumo das análises de variância do peso dos seis grupos de ratos no período de 21 dias

FV	GL	Quadrados médios
Grupo (G)	5	21956,13**
Resíduo A	24	985,76
Tempo (t)	3	3900,20 **
G x t	15	784,97 **
Resíduo B	72	76,46
CV parcela (%)		16,02
CV subparcela (%)		4,46

** F significativo a 1% de probabilidade.

O Quadro 12 apresenta o desdobramento dos grupos de ratos, dentro de cada tempo de avaliação, com relação ao peso corporal. Os resultados indicam ter havido diferença significativa entre os estados (E) nos quatro tempos de avaliação, a 1% de probabilidade. Nos tratamentos (Tr) só houve efeito significativo no início de cada tratamento (Dia 0). A interação estado x tratamento (E x Tr) só foi significativa, a 5% de probabilidade, no início do tratamento (Dia 0).

De acordo com o Quadro 12, o peso do grupo Controle diferiu significativamente do do grupo Testemunha nos quatro tempos de avaliação, a 1% de probabilidade.

Quadro 12 – Desdobramento dos grupos de ratos dentro de cada tempo, com relação ao peso

FV	GL	Quadrados médios			
		Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Trat 1	5	2956,24	5445,50	7141,55	8767,76
Fatorial (F)	(3)	2758,58 **	5439,00 **	7900,05 **	10892,94 **
Estado (E)	1	5746,05 **	16245,00 **	23324,46 **	32000,01 **
Tratamento (Tr)	1	1201,25 *	7,20 ns	224,45 ns	405,00 ns
E x Tr	1	1328,45 *	64,80 ns	151,25 ns	273,80 ns
Controle (C)	1	6300,10 **	10824,10 **	10497,60 **	8999,99 **
F vs C	1	205,36 ns	86,24 ns	1510,15 *	2159,99 **
Resíduo comb.	35	243,03	243,03	243,03	243,03

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo.

A comparação dos efeitos das antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* no peso corporal dos ratos, nos quatro tempos de avaliação, é apresentada no Quadro 13.

No caso dos ratos normais não houve diferença significativa, pelo teste F, entre o tratamento com antocianinas de uvas (UVA – N) e antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P. – N) nos quatro tempos de avaliação.

No caso dos ratos diabéticos só houve diferença significativa dos pesos, pelo teste F, entre o tratamento com antocianinas de uvas (UVA – D) e antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P. – D) no início do tratamento (Dia 0). Nos outros tempos de avaliação não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Quadro 13 - Comparação de ratos diabéticos e normais e de antocianinas de uvas roxas (UVA) e de *Tradescantia pallida* (T.P.) com relação ao peso (g), em diferentes tempos de avaliação

Período	Tratamento	Peso corporal (g)	
		Normais	Diabéticos
Dia 0			
	Controles	206,2	156,0
	UVA	204,0 Aa	156,0 Ba
	T.P.	203,2 Aa	185,6 Ab
7º dia			
	Controles	224,0	158,2
	UVA	218,4 Aa	157,8 Ba
	T.P.	213,6 Aa	160,2 Ba
14º dia			
	Controles	243,0	178,2
	UVA	235,8 Aa	162,0 Ba
	T.P.	223,6 Aa	160,8 Ba
21º dia			
	Controles	251,8	191,8
	UVA	244,6 Aa	172,0 Ba
	T.P.	243,0 Aa	155,6 Ba

Controles: normais (Testemunha) e diabéticos (Controle).

Em cada linha, A > B pelo teste F.

Em cada coluna, a > b pelo teste F.

4.6. Efeito de antocianinas nas proteínas colagenosas e não-colagenosas

O efeito do extrato antociânico de uvas roxas (UVA) e *Tradescantia pallida* (T.P.) no nível de proteínas colagenosas (PC) e proteínas não-colagenosas (PNC) foi avaliado por um modelo experimental, utilizando-se ratos albinos *Wistar* normais e com diabetes induzido por aloxano. Os níveis de proteínas colagenosas e proteínas não-colagenosas foram determinados no fêmur e na tíbia das pernas traseiras e no úmero, no rádio e na ulna das pernas dianteiras do lado direito dos animais dos seis grupos, após um período de avaliação de 21 dias.

No Quadro 14 é apresentado o resumo das análises de variância para as proteínas colagenosas das patas traseiras (PCT), proteínas colagenosas das patas dianteiras (PCD), proteínas não-colagenosas das patas traseira (PNCT) e proteínas não-colagenosas das patas dianteiras (PNCD) dos seis grupos de ratos avaliados no período de 21 dias.

Quadro 14 – Resumo das análises de variância de proteína colagenosa traseira (PCT), proteína colagenosa dianteira (PCD), proteína não-colagenosa traseira (PNCT) e proteína não-colagenosa dianteira (PNCD) dos seis grupos de ratos avaliados ao final de 21 dias

FV	GL	Quadrados médios			
		PCT	PCD	PNCT	PNCD
Grupo (G)	(5)	188,6075 **	102,6293 **	0,2398 **	0,3428 **
Fatorial (F)	(3)	117,2900 **	27,6117 *	0,3254 **	0,3386 **
Estado (E)	1	27,3312 ns	2,8351 ns	0,5528 **	0,6808 **
Tratamento (Tr)	1	19,0906 ns	12,5611 ns	0,2405 **	0,1381 *
E x Tr	1	305,4483 **	67,4546 **	0,1830 **	0,1968 *
Controle (C)	1	475,9621 **	249,3005 **	0,0322 **	0,0001 ns
F vs C	1	115,2054 **	180,9954 **	0,1906 **	0,6982 **
Resíduo	24	6,6975	3,8241	0,0021	0,0317
CV (%)		5,81	4,68	8,22	18,69

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5% de probabilidade.

ns F não-significativo.

De acordo com o resumo das análises de variância apresentado no Quadro 14, não houve diferença significativa entre o estado (E), normal e diabético, e entre os tratamentos (Tr), UVA e T.P., para as proteínas colagenosas das patas traseiras e dianteiras (PCT e PCD). Com relação ao nível de proteínas não-colagenosas das patas traseiras e dianteiras (PNCT e PNCD), houve diferença significativa, a 1% de probabilidade, no estado (E) e no tratamento (Tr). A interação estado x tratamento (E x T) foi significativa nos quatro tipos de proteínas.

Os grupos Testemunha (T – N) e Controle (C – D) diferiram significativamente, a 1% de probabilidade, pelo teste de Dunnett, exceto para as proteínas não-colagenosas das patas dianteiras (PNCD).

4.6.1. Proteínas colagenosas

Muitas das complicações decorrentes do diabetes melito ocorrem em tecidos ricos em colágeno e assemelham-se a doenças características do envelhecimento, como aterosclerose; aumento da rigidez do colágeno dos pulmões, das artérias, da pele e das articulações; engrossamento dos capilares e das membranas basais; osteoartrites (MONNIER et al.; 1984); dificuldade de cicatrização; e diminuição da formação dos ossos e do crescimento, dentre outras (SPANHEIMER et al., 1988). Colágeno de humanos diabéticos apresenta mais ligações cruzadas e menor solubilidade e digestibilidade por collagenases (VISHWANATH et al., 1986), tornando-se mais rígido e mais estável com a idade (HAMLIN et al., 1975).

Por ser o colágeno o principal componente do tecido conjuntivo, examinaram-se os efeitos de antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas na produção de colágeno total em ratos com diabetes induzido por aloxano.

No Quadro 15 são apresentados os valores médios $\pm$ erros-padrão dos níveis de proteínas colagenosas das patas traseiras (PCT) e dianteiras (PCD) dos seis grupos de ratos, após 21 dias de tratamento.

Quadro 15 – Valores médios $\pm$ erros-padrão (%) do nível de proteína colagenosa traseira (PCT), proteína colagenosa dianteira (PCD) dos grupos de ratos normais (N) e diabéticos (D) tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA) e de *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T- N) Controle (C – D)

Grupos		PCT (%)	PCD (%)
T	(N)	40,56 $\pm$ 0,72 A	40,30 $\pm$ 1,86 A
C	(D)	54,25 $\pm$ 1,58 a	50,28 $\pm$ 0,50 a
UVA	(N)	39,48 $\pm$ 0,68 Ab	37,83 $\pm$ 0,49 Ab
T.P.	(N)	49,25 $\pm$ 1,77 Bb	43,08 $\pm$ 0,22 Ab
UV	(D)	44,96 $\pm$ 0,90 Bb	40,75 $\pm$ 0,37 Ab
T.P.	(D)	39,10 $\pm$ 0,76 Ab	38,66 $\pm$ 0,68 Ab

Para cada proteína (coluna), médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula não diferem, respectivamente, da Testemunha e do Controle, pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

Uma comparação entre os níveis médios de proteínas colagenosas totais do grupo de ratos normais não-tratados (Testemunha) e do grupo de ratos diabéticos não-tratados (Controle) mostra aumento de 25,23% no nível de proteínas colagenosas das patas traseiras (PCT) e de 19,85% no nível de proteínas colagenosas das patas dianteiras (PCD). A diferença entre os dois controles foi significativa, a 1% de probabilidade, pelo teste F, cujos valores de variância são apresentados no Quadro 14.

O aumento do nível de proteínas colagenosas em diabéticos também foi observado por VISHWANATH et al. (1986). VISHWANATH et al. (1986) observaram que indivíduos diabéticos apresentam aumento médio de 42% no nível de colágeno em relação aos valores do controle. Estes autores observaram, também, aumento da glicosilação e do conteúdo de colágeno na pele de indivíduos diabéticos do tipo I, insulino-dependente.

Não se sabe, entretanto, se o aumento da quantidade de colágeno em indivíduos diabéticos é devido ao aumento da síntese ou diminuição da degradação do colágeno (VISHWANATH et al., 1986).

SPANHEIMER et al. (1988) observaram que, após duas semanas de indução do diabetes em ratos, a produção de colágeno foi significativamente reduzida nos ossos e nas cartilagens para 52% e 51%, em relação aos níveis do controle, respectivamente. Os autores observaram, também, que o aumento do número de ligações cruzadas do colágeno leva à diminuição do colágeno solúvel e ao acúmulo de colágeno nos tecidos mediante aumento da meia-vida. As modificações no colágeno podem levar a um excesso de acumulação desta proteína, sob condições em que é diminuída a sua síntese (SPANHEIMER et al., 1988).

MOHANAM e BOSE (1981), estudando ^3H -hidroxiprolina nos colágenos solúvel e insolúvel, observaram diminuição da síntese e aumento do catabolismo de colágeno, acompanhados por uma conversão do colágeno solúvel para o insolúvel.

BEHERA e PATNAIK (1979) analisaram os níveis de colágeno solúvel e colágeno total em ossos de fêmeas de ratos Swiss com diabetes induzido por aloxano, o qual não levou a aumento significativo na quantidade de colágeno total após um período de tratamento de 96 horas ou 28 dias. Entretanto, o nível de colágeno solúvel em ácido acético nos ratos diabéticos sofreu diminuição significativa, a 1% de probabilidade, em comparação com os ratos normais, grupo Testemunha.

Os ratos diabéticos tratados com antocianinas de uvas roxas e antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentaram níveis de proteínas colagenosas, nas patas dianteiras (PCD), semelhantes aos de ratos normais, não-tratados, grupo Testemunha. Os níveis de proteínas colagenosas das patas traseiras (PCT) do grupo de ratos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* também alcançaram níveis semelhantes aos apresentados pelo grupo Testemunha. As patas traseiras dos ratos tratados com antocianinas de uvas roxas apresentaram níveis menores de proteínas colagenosas que os ratos diabéticos, não-tratados, grupo Controle. Os níveis de proteínas colagenosas dos dois grupos diferiram significativamente pelo teste de Dunnett.

No caso dos ratos normais, aqueles tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA – N) apresentaram os mesmos níveis de proteína colagenosa no tecido ósseo das patas traseiras (PCT) e dianteiras (PCD), em relação ao grupo Testemunha. Os níveis de proteínas colagenosas das patas traseiras (PCT) e dianteiras (PCD) dos ratos normais tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentaram-se menores que os do grupo Controle, diferindo, significativamente, pelo teste de Dunnett.

Lagruet et al. (1979), citados por TIMBERLAKE e HENRY (1988), em um ensaio clínico com 54 pacientes diabéticos, forneceram 500-600 mg/dia de antocianinas de uvas da espécie *Vaccinium myrtillus* por 8 a 33 meses, observando normalização quase total do colágeno. BONIFACE et al. (1986) também observaram a ação de antocianinas de uvas, *Vaccinium myrtillus*, na redução da biossíntese de colágeno em humanos diabéticos.

VERTOMMEN et al. (1994) verificaram diminuição do colágeno na pele de fêmeas de ratos *Wistar* tratados com o flavonóide diosmina. Os resultados não diferiram significativamente dos encontrados em ratos normais.

ODETTI et al. (1990) observaram a inibição do avanço da reação de glicosilação no tecido conjuntivo de ratos tratados com uma dose diária de 1g/kg de aminoguanidina e do flavonóide rutina. O estudo foi realizado, medindo-se a fluorescência dos produtos de glicosilação formados. Dados gerais dos produtos de glicosilação foram significativamente menores que em diabéticos não-tratados.

Também BROWNLEE et al. (1986) constataram o efeito da aminoguanidina, um composto nucleofílico de hidrazina, na prevenção da formação de colágeno com ligações cruzadas, *in vitro*, e nas paredes das artérias de ratos com diabetes induzido. De acordo com BROWNLEE et al. (1986), a formação de proteínas com ligações cruzadas pode ser prevenida se a carbonila reativa dos produtos iniciais de glicosilação puder ser bloqueada.

4.6.2. Proteínas não-colagenosas

De acordo com GUNDBERG et al. (1986), proteínas não-colagenosas também podem sofrer glicosilação, como a proteína do cristalino dos olhos, as lipoproteínas de baixa densidade, a albumina, a fibronectina e as proteínas dos nervos. Modificações dessas proteínas freqüentemente alteram suas funções.

Neste trabalho, avaliaram-se os efeitos de antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* nos níveis de proteínas não-colagenosas do tecido ósseo das patas traseiras e dianteiras de ratos diabéticos. Os valores médios $\pm$ erros-padrão dos níveis de proteínas não-colagenosas encontrados são apresentados no Quadro 16.

Quadro 16 – Valores médios $\pm$ erros-padrão (%) do nível de proteína não-colagenosa traseira (PNCT) e proteína não-colagenosa dianteira (PNCD) dos grupos de ratos normais (N) e diabéticos (D) tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA) e de *Tradescantia pallida* (T.P.) e de ratos não-tratados, Testemunha (T- N) e Controle (C – D)

Grupos	PNCT (%)	PNCD (%)
T (N)	0,39 $\pm$ 0,02 A	1,17 $\pm$ 0,06 A
C (D)	0,51 $\pm$ 0,01 a	1,16 $\pm$ 0,08 a
UVA (N)	0,44 $\pm$ 0,02 Aa	0,48 $\pm$ 0,11 Bb
T.P. (N)	0,47 $\pm$ 0,03 Aa	0,84 $\pm$ 0,08 Bb
UV (D)	0,58 $\pm$ 0,02 Ba	1,05 $\pm$ 0,09 Aa
T.P. (D)	0,99 $\pm$ 0,01 Bb	1,01 $\pm$ 0,19 Aa

Para cada proteína (coluna), médias seguidas de mesma letra maiúscula e minúscula não diferem, respectivamente, da Testemunha e do Controle, pelo teste de Dunnett ($P > 0,05$).

Comparando o nível médio de proteínas não-colagenosas totais do grupo de ratos normais não-tratados (T - N) com o do grupo de ratos diabéticos não-tratados (C – D), observa-se aumento de 25,53% no nível de proteínas colagenosas das patas traseiras (PNCT).

De acordo com o resumo das análises de variância apresentado no Quadro 14 e com os valores médios dos níveis de proteínas não-colagenosas, não houve diferença significativa, entre os grupos Testemunha e Controle, quanto ao nível de proteína não-colagenosa das patas dianteiras (PNCD). Estes resultados indicam não ter ocorrido alteração do nível de PNCD no grupo de ratos diabéticos não-tratados (C – D). SPANHEIMER et al. (1988) também não observaram alteração na produção de proteínas não-colagenosas nos ossos e nas cartilagens em relação aos tecidos do grupo controle.

GUNDBERG et al. (1986) observaram aumento da glicosilação da proteína não-colagenosa osteocalcina, com o decorrer da idade, nos ossos humanos e de bovinos. O aumento da quantidade de glicosilação da osteocalcina no ossos de indivíduos idosos pode alterar a afinidade entre a osteocalcina e a hidroxiapatita e, assim, ter um importante papel na patogênese da osteoporose senil e na osteopenia que acompanha indivíduos com diabetes melito.

SPANHEIMER et al. (1988) não verificaram alteração dos níveis de proteínas não-colagenosas totais, o que está de acordo com os dados encontrados para proteínas não-colagenosas das patas traseiras (PNCT). GUNDBERG et al. (1986) observaram os efeitos da glicosilação somente na proteína não-colagenosa osteocalcina, o que não foi feito neste trabalho.

Os resultados encontrados para as patas traseiras (PNCT) não foram similares aos encontrados para as patas dianteiras (PNCD). No primeiro caso, ocorreu aumento do nível de proteínas não-colagenosas no grupo de ratos diabéticos, quando comparado com o do grupo Testemunha; já no caso das proteínas não-colagenosas das patas dianteiras (PNCD) não houve diferença significativa entre os dois controles.

O nível de proteínas não-colagenosas das patas traseiras (PNCT) dos ratos normais tratados com antocianinas de uvas roxas e antocianinas de *Tradescantia pallida* manteve-se no nível das proteínas não-colagenosas do grupo Testemunha, de acordo com o teste de Dunnett. As patas traseiras dos ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas apresentaram aumento no nível de proteínas não-colagenosas quando comparado

com o do grupo Testemunha, pelo teste de Dunnett. O aumento no nível de proteínas não-colagenosas dos ratos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* foi maior que o observado no grupo Controle, ratos diabéticos não-tratados.

Observou-se redução no nível de proteínas não-colagenosas das patas dianteiras (PNCD) dos ratos normais, quando comparado com o dos grupos Testemunha e Controle. Não ocorreu nenhuma alteração significativa nos níveis de proteínas colagenosas dos ratos diabéticos, tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* e uvas roxas.

Laguer et al. (1979), citados por TIMBERLAKE e HENRY (1988), e BONIFACE et al. (1986) observaram redução dos níveis de glicoproteínas, quando indivíduos diabéticos foram tratados com antocianinas de *Vaccinium myrtillus*. Neste trabalho não foram analisados os níveis de glicoproteína isoladamente, mas os das proteínas não-colagenosas como um todo.

No Quadro 17 é apresentada a comparação dos efeitos das antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* nos níveis de proteínas colagenosas e proteínas não-colagenosas das patas traseiras e dianteiras, após 21 dias de tratamento.

O grupo de ratos normais tratados com antocianinas de uvas roxas (UVA – N) apresentou menor nível de proteínas colagenosas em relação ao grupo de ratos normais, tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* (T.P.), nas patas traseiras e dianteiras. As patas traseiras dos ratos tratados com antocianinas de uvas roxas apresentaram um teor de proteínas colagenosas (PCT) 19,84% menor que o das patas traseiras dos ratos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida*, enquanto as patas dianteiras apresentaram menos 12,19% de proteínas colagenosas (PCD) em comparação com as patas dianteiras dos ratos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida*.

O grupo de ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentaram nível de proteínas colagenosas menor que o do grupo de ratos diabéticos tratados com antocianinas de uvas roxas. Os ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentaram menos 13% de

proteínas colagenosas nas patas traseiras (PCT) em relação aos ratos tratados com antocianinas de uvas roxas. As patas dianteiras dos ratos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* tiveram redução de 5,13% no nível de proteína colagenosa (PCD), mas esta diferença não foi considerada significativa pelo teste F.

Essas comparações confirmam que antocianinas de *Tradescantia pallida* tiveram um melhor efeito na redução do nível de proteínas colagenosas no tecido ósseo das patas traseiras e dianteiras de ratos diabéticos, em relação às antocianinas de uvas roxas. Entretanto, antocianinas de uvas roxas apresentaram maior efeito de redução do nível de proteínas colagenosas nos ratos normais.

Os níveis de proteínas não-colagenosas das patas traseiras (PNCT) dos grupos de ratos normais tratados com antocianinas de uvas roxas e antocianinas de *Tradescantia pallida* não diferiram, significativamente, pelo teste F. Nas patas dianteiras, os grupos de ratos normais tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentaram maior nível de proteínas não-colagenosas (PNCD).

No caso dos ratos diabéticos, o nível de proteínas não-colagenosas das patas traseiras (PNCT) foi menor para o grupo de ratos tratados com antocianinas de uvas roxas. Nas patas dianteiras (PNCD) não houve diferença significativa entre os dois tratamentos.

Quadro 17 – Comparação de ratos diabéticos e normais e de antocianinas de uvas roxas (UVA) e de *Tradescantia pallida* para proteína colagenosa traseira (PCT), proteína colagenosa dianteira (PCD), proteína não-colagenosa traseira (PNCT) e proteína não-colagenosa dianteira (PNCD) aos 21 dias de tratamento

Tratamentos	Normais	Diabéticos
PCT (%)		
Controles	40,56	54,25
UVA	38,48 Bb	44,96 Aa
T.P.	49,25 Aa	39,10 Bb
PCD (%)		
Controles	40,30	50,28
UVA	37,83 Bb	40,75 Aa
T.P.	43,08 Aa	38,66 Ba
PNCT (%)		
Controles	0,39	1,17
UVA	0,44 Ba	0,58 Ab
T.P.	0,47 Ba	0,99 Aa
PNCD (%)		
Controles	0,51	1,16
UVA	0,48 Bb	1,05 Aa
T.P.	0,84 Aa	1,01 Aa

Controles: normais (Testemunha) e diabéticos (Controle).

Em cada linha, A > B pelo teste F.

Em cada coluna, a > b pelo teste F.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Durante o diabetes melito, a formação de produtos finais de glicosilação e ligações cruzadas aumenta, resultando em alterações de propriedades do colágeno, o que contribui para o desenvolvimento de patologias típicas do diabetes e do envelhecimento. Por ser o colágeno o principal componente do tecido conjuntivo, examinaram-se os efeitos de antocianinas de uvas roxas, enocianinas, e de *Tradescantia pallida* na produção de colágeno total no tecido ósseo das patas de ratos normais e com diabetes induzido por aloxano. Avaliaram-se, também, os níveis de proteínas não-colagenosas totais das patas traseiras e dianteiras dos ratos do experimento. Para controle do diabetes, os níveis de glicose sangüínea e o peso corporal foram avaliados a cada sete dias.

As antocianinas de uvas roxas utilizadas encontravam-se na forma de pó, solúvel em água e usado comercialmente como corante alimentício. Antocianinas de folhas de *Tradescantia pallida* foram extraídas com uma solução etanol:água (60:40), acidificada com HCl 0,1%. O extrato foi parcialmente purificado por cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária a polivinilpolipirrolidona. Doses diárias de 50 mg de antocianinas foram administradas aos ratos do ensaio biológico durante um período de 21 dias. O nível de proteínas colagenosas e não-colagenosas foi avaliado ao final do período de 21 dias.

A indução do diabetes melito foi feita por meio de administração intravenosa da droga aloxano, em uma concentração de 60 mg/kg de peso corporal. A eficiência da indução foi de cerca de 20%, devido à resistência ou morte dos animais. O nível mínimo de glicose sangüínea dos animais diabéticos foi de 125 mg/dL. Os ratos diabéticos apresentaram aumento do nível de proteínas colagenosas nas patas traseiras e dianteiras.

Antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* não apresentaram efeito hipoglicemiante quando uma dose diária de 50 mg foi administrada aos ratos normais e diabéticos.

Embora o consumo de alimento não tenha diferido em nenhum dos seis grupos de ratos, os animais normais tratados com antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* e os diabéticos tratados com antocianinas de uvas roxas apresentaram ganho de peso corporal menor que o dos ratos normais não-tratados. O grupo de ratos diabéticos tratados com antocianinas de *Tradescantia pallida* apresentou queda constante de peso corporal no decorrer dos 21 dias de tratamento. A perda de peso é muito comum em indivíduos diabéticos; porém, como ratos normais tratados com antocianinas de uvas roxas e de *Tradescantia pallida* não apresentaram perda de peso corporal, pode-se supor que esta perda não esteja relacionada com o consumo de antocianinas.

Houve efeito do tratamento com antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas na redução dos níveis de proteínas colagenosas do tecido ósseo das patas dianteiras e traseiras de ratos com diabetes induzido por aloxano. Os efeitos de antocianinas extraídas de uvas roxas foram mais eficientes na redução de proteínas colagenosas no tecido ósseo de ratos normais. O efeito de antocianinas de *Tradescantia pallida* foi mais pronunciado nos ratos diabéticos.

Não houve similaridade de resultados entre os teores totais de proteínas não-colagenosas das patas traseiras e dianteiras, podendo-se concluir, apenas, que houve redução dos níveis de proteínas não-colagenosas nos ratos normais.

As pesquisas realizadas demonstram a potencialidade das antocianinas de *Tradescantia pallida* e de uvas roxas na redução dos níveis de colágeno total de animais com diabetes induzido por aloxano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos**: teoria e prática. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1995. 335p.
- ARDUÍNO, F. **Conheça seu diabetes**. 5.ed. Rio de Janeiro: Expressão e Cultura, 1979. 196p.
- BAUBLIS, A.J., JIMÉNEZ, M.D.B. Structural and conformational characterization of a stable anthocyanin from *Tradescantia pallida*. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 3, p. 640-646, 1995.
- BEHERA, H.N., PATNAIK, B.K. In vivo and in vitro effects of alloxan on collagen characteristics of bone, skin and tendon of Swiss mice. **Gerontology**, v. 25, n. 5, p. 255-260, 1979.
- BERENSON, G.S., RADHAKRISHNAMURTHI, B., DALFERES, E.R., RUIZ, H., SRINIVASAN, S.R., PLAVIDAL, F., BRICKMAN, F. Connective tissue macromolecular changes in rats with experimentally induced diabetes and hyperinsulinism. **Diabetes**, v. 21, n. 6, p. 733-743, 1972.
- BETTINI, V., ARAGNO, R., BETTINI, M.B., BRAGGION, G., CALORE, L., MORIMANDO, I., PENADA, G. Facilitating influence of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on the acetylcholine-induced relaxation of isolated coronary arteries: role of the endothelium-derived relaxing factor. **Fitoterapia**, v. 64, n. 1, p. 45-57, 1993.

- BOBBIO, P.A., BOBBIO, F.O. **Introdução a química de alimentos**. Campinas: Fundação Cargill, 1985. 306p.
- BONDY, P.K. Disorders of carbohydrate metabolism. In: **Duncan's - diseases of metabolism**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1969. p. 225 – 267.
- BONIFACE, R., MISKULIN, M., ROBERT, L., ROBERT, A.M. Pharmacological properties of Myrtillus anthocyanosides: Correlation with results of treatment of diabetic microangiopathy. **Studies in Organic Chemistry**, v. 23, p. 293 -301, 1986.
- BOREL, J.P., RANDOUX, A., LE PEUCH, C., MAQUART, F.X., VALEYRE, J. **Bioquímica dinâmica**. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1989. 800p.
- BOSKEY, A.L. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. **Bone and Mineral**, v. 6, p. 11-123, 1989.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248 - 254, 1976.
- BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982. p.1-40.
- BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanin colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1311 - 1323, 1983.
- BROWNLEE, M., VLAASSARA, H., KOONEY, A., ULRICH, P., CERAMI, A. Aminoguanidina prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. **Science**, v. 232, n. 4578, p. 1629 - 1632, 1986.
- CHAUHAN, U.P.S., RASTOGI, V.K., JAGGI, C.B. Protein metabolism in various tissues of alloxan diabetic rats. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 17, n. 8, p. 783-785, 1979.
- DECKER, A.L. (Ed.) **Worthington enzyme manual**. New Jersey, EUA: Worthington biochemical corporation, 1977. 346p.
- DRENSKA, D., BANTUTOVA, I., OVCHAROV, R. Anti-convulsant effect of anthocyanins and antioxidants. **Farmatsiya**, v.39, p. 454-457, 1989.

- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 7, p. 1080, 1977.
- FONTES, E.P.B. **Análise eletroforética da proteína de reserva de cultivares de soja e caracterização de mutantes**. Viçosa, MG: UFV, 1983. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1983.
- FRANCIS, F.J. Analysis of Anthocyanins. In: MARKAKIS, P. (Ed.). **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p.181-207.
- FRANCIS, F.J. Pigments and others colorants. In: **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 545 - 584.
- FRANCIS, F.J. A new group of food colorants. **Trends en Food Science e Technology**, v. 3, p. 27 - 30, 1992.
- FREUND, P.R., WASHAN, C.J., MAGGLON, M. Natural color for use in foods. **Cereal Foods World**, v. 33, n. 7, p. 553 - 559, 1988.
- FULEKI, T., FRANCIS, F.J. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. **Journal of Food Chemistry**, v. 33, p. 72 - 77, 1968.
- GORRAY, K.C., BASKIN, D.G., BRODSKY, J. Response of pancreatic B cells to alloxan and streptozotocin en the guinea pig. **Pancreas**, v.1, p. 130-138, 1986.
- GOTO, T., KONDO, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins - flower color variation. **Angewandte Chemie International Edition English**, v. 30, p. 17 - 33, 1991.
- GUNDBERG, C.M., ANDERSON, M., DICKSON, I., GALLOP, P.M. Glycated osteocalcin in human and bovine bone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 31, p. 14557 - 14561, 1986.
- HAMLIN, C.R., KOHN, R.R., LUSCHIN, J.H. Apparent accelerated aging of human collagen in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 24, n. 10, p. 902 - 904, 1975.
- HAUSCHKA, P.V., LIAN, J.B., GALLOP, P.M. Direct identification of the calcium-binding amino acid, γ -carboxyglutamate, in mineralised tissue.

- Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 10, p. 3925 - 3929, 1975.
- HRAZDINA, G. Column chromatographic isolation of the anthocyanidin-3,5-diglucosides from grapes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 243 - 245, 1970.
- IDAKA, E., OGAWA, T., KONDO, T. GOTO, T. Isolation of highly acylated anthocyanins from *Commelinaceae* plants, *Zebrina pendula*, *Rhoeo spathacea* and *Setcreasea purpurea*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2215 - 2220, 1987.
- IGARASHI, K., ABE, S., SATOH, J. Effects of *Atsumi-kabu* (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) anthocyanin on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 171 - 175, 1990.
- JACKMAN, R.L., YADA, R.Y., TUNG, M.A. Anthocyanins as food colorants – A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, n. 3, p. 201 - 247, 1987.
- JOINT FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Toxicological evaluation of certain food additives**. Geneva: 1982. (WHO Food Additives Series, 17).
- KINSELLA, J.E., FRANKEL, E., GERMAN, B., KANNER, J. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in the wine and plant foods. **Food Technology**, v. 47, p. 85 - 89, 1993.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1985. 723p.
- LIAN, J.B., GLIMCHER, M.J., ROUFOSSE, A.H. Alterations of the γ -carboxyglutamic acid and osteocalcin concentrations in vitamin D deficient chickbone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 9, p. 4999-5003, 1982.
- MACHADO, L. D. Coração roxo. **Natureza**, São Paulo, n.101, p. 24-26, 1996.
- MAHAN, L.K., KRAUSE, M.T.A. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 8.ed. São Paulo: Roca, 1994. 957p.
- MARCIANO, C. **Efeito de amido da fruta da lobeira no controle de diabetes mellitus**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.

- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in food. In: **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p.163-180.
- MAZZA, G., BROUILLARD, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. **Food Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 207-225, 1987.
- METIVIER, R.P., FRANCIS, F.J., CLYDESDALE, F.M. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 4, p. 1099 - 1100, 1980.
- MOHANAM, S., BOSE, S. Influence of streptozotocin and alloxan induced diabetes on the metabolism of dermal collagen in albino rats. **Acta Diabetologica**, v.18, n. 3, p. 251-258, 1981.
- MONNIER, V.M., KOHND, R.R., CERAMI, A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 2, p. 583-587, 1984.
- MORAZZONI, P., MAGISTRETTI, M.J. Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue. **Fitoterapia**, v. 57, n. 1, p. 11-14, 1986.
- MORDESS, J.P., ROSSINI, A.A. Animal models of diabetes. **The American Journal of Medicine**, v. 70, p. 353-360, 1981.
- NKONGE, C., BALLANCE, G.M. A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in Micro-Kjeldahl digests. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 416-420, 1982.
- ODETTI, P.R., BORGOGLIO, A., PASCALE, A., ROLANDI, R., ADEZATI, L. Prevention of diabetes-increased aging effect on rat collagen-linked fluorescence by aminoguanidine and rutine. **Diabetes**, v. 39, n. 7, p. 796-800, 1990.
- OSAWA, Y. Copigmentation of anthocyanins. In MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyaninis as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 41 - 86.
- PALLARDO, J.P.M. **Advances in diabetes**. Madrid: Grupo Aula Médica, 1997. 269p.
- PEMBERTON, J.B., MANAX, W.G. Problems in producing alloxan diabetes. **Surgery**, v. 68, n. 2, p. 375-378, 1970.

- POSNER, A.S. Bone mineral on the molecular level. **Federal Procurement**, v. 32, n. 8, p. 1933-1937, 1973.
- POTTS, J.T., DEFTOS, L.J. Parathyroid hormone, thyrocalcitonin, vitamin D, bone and bone mineral metabolism. In: BONDY, P.K. (Ed.) **Duncan's - diseases of metabolism**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1969. p. 938 – 948.
- POURRAT, H., BASTIDE, P., DORIER, P., POURRAT, A., TRONCHE, P. Préparation et activité thérapeutique de quelques glycosides d'anthocyanes. **Chimie Thérapeutique**, v. 2, n. 1, p. 33 - 38, 1967.
- PRICE, P.A., OTSUKA, A.S., POSER, J.W. Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 73, n.3, p. 1447 - 1451, 1976.
- PROCKOP, D.J., WILLIAMS, C.J. Structure of the organic matrix: collagen structure (chemical). In: NANCOLLAS, G.H. (Ed.) **Biological mineralization and demineralization**. New York: Springer-Verlag, 1982. p. 161 – 165.
- REGNAULT, F., KERN, P., LAURENT, M. Proceedings: Dynamic studies of collagen and structural glycoproteins of connective tissue in the course of diabetes. Correlation with basement membrane modifications in capillaries. **Experimental Eye Research**, v. 17, n. 4, p. 399, 1973.
- SEIKEL, M. Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. In: GEISMANN, T.A. (Ed.) **The chemistry of flavonoids compounds**. New York: Macmillan, 1962. p.34.
- SHI, Z., DAUN, H., FRANCIS, F.J. Major anthocyanin from *Tradescantia pallida*: Identification by LSI-MS and chemical analyses. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 5, p. 1068 - 1069, 1993.
- SHI, Z., LIN, M., FRANCIS, F.J. Stability of anthocyanins from *Tradescantia pallida*. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 758 - 760, 1992a.
- SHI, Z., LIN, M., FRANCIS, F.J. Anthocyanins of *Tradescantia pallida* Potencial Food colorants. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 761- 764, 1992b.
- SHI, Z., FRANCIS, F.J., DAUN, H. Quantitative comparison of the stability of anthocyanins from *Brassica oleracea* and *Tradescantia pallida* in non-sugar

- drink model and protein model systems. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 768 - 770, 1992c.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, J.R. **Bioquímica: mamíferos**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 620p.
- SPANHEIMER, R.G., UMPIERREZ, G.E., STUMPF, V. Decreased collagen production in diabetic rats. **Diabetes**, v. 37, n. 4, p. 371 - 376, 1988.
- STRACK, D., WRAY, V. Anthocyanins In: **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1989. v.1. p.335-356.
- STRINGHETA, P.C. Antocianinas - estudos de novas fontes. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 188 - 193, 1992.
- TAMURA, H., YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey a grape. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1612 - 1615, 1994.
- TANCHEV, S.S., TIMBERLAKE, C.F. The anthocyanins of red cabbage (*Brassica oleracea*). **Phytochemistry**, v. 8, n. 9, p. 1825-1827, 1969.
- TEH, L.S., FRANCIS, F.J. Stability of anthocyanins from *Zebrina pendula* and *Ipoema tricolor* in a model beverage. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 5, p. 1579 - 1581, 1988.
- TIMBERLAKE, C.F., BRIDLE, P. Anthocyanins. In: WALFORD, J. (Ed.) **Developments in food colours**. London: Applies Science Publishers, 1980. p.115 - 149.
- TIMBERLAKE, C.F., HENRY, B.S. Anthocyanins as natural food colorants. In: CODY, V., MIDDLETON, E., HARBORNE, J., BERETZ, A. (Ed.) **Progress in clinical and biological research. Volume 280. Plant Flavonoids in Biology and Medicine II: Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties**. New York: Alan R. Liss, 1988. p. 107-121 (Progress in clinical and biological research, 280).
- TOMASEK, J.J., MEYERS, S.W., BASINGER, J.B., GREEN, D.T., SHEW, R.L. Diabetic and age-related enhancement of collagen-linked fluorescence in cortical bones of rats. **Life science**, v. 55, n. 11, p. 855 - 861, 1994.
- TSUDA, T., WATANABE, M., OHSHIMA, K., NORINOBU, S., CHOI, S.W., KAWAKISHI, S., OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin

- pigments cyanidin 3-O- β -D-glucoside and cyanidin. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2407 - 2410, 1994.
- VERTOMMEN, J., VAN DEN ENDEN, M., SIMOENS, L., LEEUW, I. Flavonoid treatment reduces glycation and lipid peroxidation in experimental diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.8, p.430-432, 1994.
- VERZÁR, F. The aging of collagen fibre. **International Review Connective Tissue Research**, v. 2, p. 243 - 300, 1964.
- VISHWANATH, V., FRANK, K.E., ELMETS, C.A., DAUCHOT, P.J., MONNIER, V.M. Glycation of skin collagen in type I diabets mellitus. **Diabetes**, v. 35, n. 8., p.916 - 921, 1986.
- VOUGHAN, J.M. **The physiology of bone**. Oxford: Claredon Press, 1970. p.325.
- WASSERMAN, R.H. Ossos. In: SWENSON, M.J. (Ed.) **Dukes - fisiologia dos animais domésticos**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 799p.
- WINDLE, W.F. **Textbook of histology**. 5ed. New York: Mc Graw-Hill, 1976. 561p.
- WROSLTAD, R.E., PUTNAM, T.B. Isolation of strawberry anthocyanin pigments by adsorption on insoluble polyvinylpyrrolidone. **Journal of Food Science**, v. 34, n. 2, p.154 - 155, 1969.
- WROLSTAD, R.E., STRUTHÉRS, B.J. Polyvinylpyrrolidone column chromatography of strawberry, rhubarb, and raspberry anthocyanins. **Journal of Chromatography**, v. 55, n. 3, p. 405 - 408, 1971.
- YEP, P., GULLANDER, S., RUCKER, R.B. The effect of alloxan diabetes on skin collagen metabolism. **Experientia**, v. 15, n. 5, p. 508-509, 1972.
- YOON, K., RUTLEDGE, S.J.C., BUENAGA, R.F. Characterization of rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Biochemistry**, v. 27, n. 23, p. 8521 - 8526, 1988.
- YOSHITAMA, K. An acylated delphinidin-3-rutinoside-5,3',5'triglucoside from *Lobelia erinus*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 12, p. 1857, 1977.
- ZIPKIN, I. **Biological mineralization**. New York: J. Wiley, 1973. 899p.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Quadro 1A – Níveis de glicose sangüínea dos ratos, antes e após quatro dias da injeção intravenosa de aloxano

Rato	Glicose inicial	Glicose após aloxano	Alteração da glicose
1	82	80	- 2
2	70	72	+ 2
3	80	76	+ 16
4	57	86	+ 29
5	73	81	+ 8
6	61	58	- 3
7	68	85	- 17
8	72	82	+ 10
9	67	235	+ 168
10	66	73	+ 7
11	83	128	+ 45
12	89	85	- 4
13	96	morreu	-----
14	86	90	+ 4
15	67	75	+ 8
16	97	69	+ 28
17	73	64	+ 9
18	78	52	+ 26
19	72	72	0
20	68	222	154
21	89	165	+ 76
22	64	92	+ 28
23	84	79	- 5
24	82	81	- 1
25	76	75	- 1
26	69	72	+ 3
27	69	65	- 4
28	65	67	+ 2
29	79	84	- 5
30	57	80	+ 23
31	73	77	+ 4
32	67	60	- 7
33	68	84	+ 16
34	75	96	+ 21
35	85	82	- 3
36	51	79	+ 28
37	84	83	- 1
38	71	82	+ 9
39	75	57	- 18
40	78	83	+ 5

Quadro 1A, Cont.

Rato	Glicose inicial	Glicose após aloxano	Alteração da glicose
41	85	88	+ 3
42	80	78	- 2
43	69	74	+ 5
44	77	81	+ 4
45	72	82	+ 10
46	88	85	- 3
47	85	143	+ 58
48	70	71	+ 1
49	88	386	+ 298
50	77	173	+ 96
51	83	301	+ 218
52	87	morreu	-----
53	93	83	- 10
54	87	80	+ 7
55	85	93	+ 8
56	91	99	+ 8
57	87	94	+ 7
58	90	90	0
59	81	morreu	-----
60	79	336	+ 257
61	85	101	+ 16
62	94	249	+ 155
63	89	353	+ 264
64	91	206	+ 115
65	82	89	+ 7
66	88	88	0
67	83	328	+ 245
68	85	98	+ 13
69	90	291	+ 201
70	90	morreu	-----
71	89	92	+ 3
72	98	79	- 19
73	80	85	+ 5
74	95	85	- 10
75	81	89	+ 8
76	89	89	0
77	86	92	+ 6
78	86	305	- 219
79	83	morreu	-----
80	69	morreu	-----

APÊNDICE B

Quadro 1B – Desdobramento da interação tratamento (Tr) x tempo (t) para a glicose sanguínea

FV	GL	QM
Tr1 / t (Testemunha)	(3)	110,53 ns
Linear	1	316,84 ns
Quadrático	1	3,20 ns
Desvio	1	11,56 ns
Tr2 / t (Controle)	(3)	8294,05 *
Linear	1	12122,00 **
Quadrático	1	594,05 ns
Desvio	1	12166,04 **
Tr3 / t (UVA - N)	(3)	105,25 ns
Linear	1	0,09 ns
Quadrático	1	312,05 ns
Desvio	1	3,61 ns
Tr4 / t (T.P. - N)	(3)	147,87 ns
Linear	1	213,16 ns
Quadrático	1	28,80 ns
Desvio	1	201,64 ns
Tr5 / t (UVA. - D)	(3)	11398,19 **
Linear	1	338,56 ns
Quadrático	1	17523,20 **
Desvio	1	16332,78 *
Tr6 / t (T.P. - D)	(3)	8965,93 *
Linear	1	10650,24 **
Quadrático	1	16245,00 **
Desvio	1	2,56 ns
Resíduo	72	2422,54

Quadro 2B – Desdobramento da interação tratamento (Tr) x tempo (t) para o peso

FV	GL	QM
Tr1 / t (Testemunha)	(3)	2067,38 **
Linear	1	6068,41 **
Quadrático	1	101,25 ns
Desvio	1	32,49 ns
Tr2 / t (Controle)	(3)	1455,52 **
Linear	1	4057,69 **
Quadrático	1	162,45 ns
Desvio	1	146,41 ns
Tr3 / t (UVA - N)	(3)	1639,00 **
Linear	1	4844,16 **
Quadrático	1	39,20 ns
Desvio	1	33,64 ns
Tr4 / t (T.P. - N)	(3)	1437,12 **
Linear	1	4186,09 **
Quadrático	1	101,25 ns
Desvio	1	24,01 ns
Tr5 / t (UVA - D)	(3)	305,73 *
Linear	1	864,36 **
Quadrático	1	45,00 ns
Desvio	1	7,84 ns
Tr6 / t (T.P. - D)	(3)	920,32 **
Linear	1	1998,09 **
Quadrático	1	510,05 *
Desvio	1	252,81 ns
Resíduo	72	76,47

APÊNDICE C

Quadro 1C – Desdobramento da interação E x Tr para nível de glicose sanguínea, em diferentes tempos de avaliação

FV	GL	Quadrados médios			
		Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21
T/E1 (normais)	1	6,40 ns	40,00 ns	176,40 ns	240,10 ns
T/E2 (diabéticos)	1	8065,60 ns	1464,10 ns	35283,60 **	16728,10 *
E/T1 (UVA)	1	55502,50 **	46240,00 **	10304,10 **	85932,91 **
E/T2 (T.P.)	1	107536,90**	67404,09**	91584,90**	165636,90**
Resíduo comb	75	2784,64	2784,64	2784,64	2784,64

** F significativo a 1% de probabilidade.
 * F significativo a 5% de probabilidade.
 ns F não-significativo.

Quadro 2C – Desdobramento da interação E x Tr para peso, em diferentes tempos de avaliação

FV	GL	Quadrados médios			
		Início	Dia 07	Dia 14	Dia 21
T/E1 (normais)	1	1,60 ns	57,60 ns	372,10 ns	6,40 ns
T/E2 (diabéticos)	1	2528,10 **	14,40 ns	3,60 ns	672,40 ns
E T1 (UVA)	1	6300,10 **	9180,90 **	13616,10 **	13176,90 **
E/T2 (T.P.)	1	774,40 ns	7128,90 **	9859,60 **	19096,91 **
Resíduo comb	35	243,03	243,03	243,03	243,03

** F significativo a 1% de probabilidade.
 ns F não-significativo.

Quadro 3C – Desdobramento da interação E x Tr para proteína colagenosa traseira (PCT), proteína colagenosa dianteira (PCD), proteína não-colagenosa traseira (PNCT) e proteína não-colagenosa dianteira (PNCD) aos 21 dias de tratamento

FV	GL	Quadrados médios			
		PCT	PCD	PNCT	PNCD
T / E1 (normais)	1	238,6322 **	69,1164 **	0,0020 ns	0,3323 **
T / E2 (diabéticos)	1	85,9076 **	10,8994 ns	0,4215 **	0,0026 ns
E / T1 (UVA)	1	75,0212 **	21,3160 *	0,0498 **	0,8049 **
E / T2 (T.P.)	1	257,7593 **	48,9737 **	0,6859 **	0,0728 ns
Resíduo	24	6,6975	3,8241	0,0021	0,0317

** F significativo a 1% de probabilidade.

* F significativo a 5 % de probabilidade.

ns F não-significativo.