

SELMA COELHO LIBERATO

EFEITO DA NARINGENINA E DO AMIDO DA FRUTA-DE-LOBO EM ANIMAIS DIABÉTICOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de 'Magister Scientiae'

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

A DEUS

À minha mãe Maria do Socorro

Ao meu pai José Fernando

Ao meu marido José Ricardo

Aos meus filhos, Marina e Matheus

A minha avó Dalila

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me iluminado e me dado forças para desenvolver o curso de mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

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

À professora Neuza Maria Brunoro Costa pelo apoio constante durante o curso.

A professora Tânia Toledo de Oliveira pela confiança em mim depositada.

Aos professores Josefina Bressan Resende Monteiro, Izabel Regina dos S. Costa Maldonado e Tanus Jorge Nagem pelas críticas e sugestões.

Aos professores pelos ensinamentos das áreas de Bioquímica: George Henrique Kling de Moraes e Maria Goreti de Almeida Oliveira; de Fitopatologia: Francisco Xavier Ribeiro do Vale; de Zootecnia: Juarez Lopes Donzele e de Tecnologia de Alimentos: Paulo Henrique Alves da Silva.

Aos funcionários do Departamento de Nutrição e Saúde, em especial à Maria José Lessa, e do Laboratório de Biofármacos, José Geraldo Pinto.

A todos funcionários do Hospital Antônio Bezerra de Farias, em especial às amigas Maria Auxiliadora de Souza Murari, Karla Rodrigues Fardin Pavan e Márcia Héli da Furrechi, pelo incentivo e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Biofármacos doutorandos: Leonardo, Cíntia e Eliane; mestrandos: Rosimar, Renato, Vanessa, Fabiana e Natércia; e graduandos: Alexandre, Lucimar, Graciela, Fabiana, Jucilene, Elisângela, Lilian, Tiago e Marcelo pela enorme e constante colaboração durante todo período de realização dos ensaios biológicos.

Aos colegas de curso Luciano, Dayse, Ruth, Eliane Rosado, Geralda, Bárbara e Flávia, pelo agradável convívio durante o curso.

Aos meus pais José Fernando Coelho da Silva e Maria do Socorro Lira Coelho pelo apoio, incentivo e colaboração durante todo o curso.

A meu marido José Ricardo Liberato pelo incentivo, apoio e orientação durante a condução dos experimentos e análise dos resultados.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Àqueles professores, funcionários e colegas que, pelos seus exemplos de humildade e dedicação ao trabalho, dignificam este período de convivência e representam uma lição de vida.

BIOGRAFIA

SELMA COELHO LIBERATO, filha de José Fernando Coelho da Silva e Maria do Socorro Lira Coelho, nasceu em Viçosa, Minas Gerais.

Em 1990, graduou-se engenheiro-agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), e no mesmo ano iniciou o curso de Nutrição na UFV, concluindo-o em dezembro de 1992.

Em 1993 e 1994, trabalhou no Hospital Fundação Rio Doce, em Linhares, como nutricionista responsável pelo Serviço de Alimentação e Dietoterapia.

Em outubro de 1994, mediante aprovação no concurso, foi contratada como nutricionista do IESP, Instituto Estadual de Saúde Pública, para atuar no hospital da rede estadual do estado do Espírito Santo, Antônio Bezerra de Faria.

Em abril de 1999, iniciou o curso de mestrado em Agroquímica pela Universidade Federal de Viçosa.

LISTA DE QUADROS

1. Mortalidade, resistência à hiperglicemia e glicemia de alguns animais cobaia em função da dose de aloxano aplicada.....	15
2. Classificação, exemplos e ocorrência dos flavonóides.....	16
3. Efeito de doses de aloxano no número de coelhos diabéticos e mortos.....	32
4. Resumo das análises de covariâncias do peso e constituintes sangüíneos dos coelhos diabéticos em função dos tratamentos, ao final do experimento 1.....	33
5. Peso e níveis dos constituintes sangüíneos de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina ou farinha de fruta-de-lobo (experimento 1).....	34
6. Parâmetros estimados e coeficiente de determinação do modelo linear simples e hiperbólico de peso e constituintes sangüíneos em função do tempo em coelhos de 4 tratamentos e comparação dos coeficientes de regressão entre tratamentos e testemunha diabética (experimento 1).....	34
7. Correlação momento-produto de Pearson entre peso e constituintes sangüíneos de coelhos ao final do experimento 1.....	35
8. Peso e concentração dos constituintes sangüíneos de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina (experimento 2).....	37
9. Comparação dos coeficientes de regressão entre tratamentos e testemunha diabética (experimento 2).....	37
10. Correlação momento-produto de Pearson entre peso e constituintes sangüíneos no início do experimento 2.....	38
11. Correlação momento-produto de Pearson entre peso e constituintes sangüíneos ao final do experimento 2.....	38
12. Composição das dietas modificada e básica AIN-93G, formulada para roedores em fase de crescimento, gestação e lactação.....	47
13. Tratamentos e número de ratos em cada experimento.....	47
14. Efeito das dietas no peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos que não receberam aloxano (experimento 1).....	51
15. Número de ratos mortos e diabéticos (experimento 1).....	52
16. Variação média do peso e constituintes sangüíneos de ratos diabéticos, em relação à testemunha diabética que recebeu dieta básica (experimento 1).....	55
17. Concentração dos constituintes sangüíneos, peso e consumo alimentar total dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 1).....	56
18. Resumo das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sangüíneos de ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 1).....	57
19. Resumo das análises de covariâncias do peso e constituintes sangüíneos dos ratos diabéticos em função dos tratamentos, ao final do experimento 1.....	59
20. Correlação momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos no início do experimento 1.....	59
21. Algumas correlações momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos normais e diabéticos, ao final do experimento 1, segundo a dieta consumida e o tratamento.....	60
22. Número de ratos mortos e diabéticos (experimento 2).....	61

23. Variação média do peso e constituintes sanguíneos de ratos, em relação a testemunha diabética que recebeu dieta básica (experimento 2).....	65
24. Efeito das dietas no peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos que não receberam aloxano (experimento 2).....	65
25. Concentração dos constituintes sanguíneos, peso e consumo alimentar total dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 2).....	66
26. Resumo das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 2).....	67
27. Resumo das análises de covariâncias do peso e constituintes sanguíneos dos coelhos diabéticos em função dos tratamentos, ao final do experimento 2.....	68
28. Efeito da alteração da dieta no peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos em ratos diabéticos que não receberam naringenina (experimento 2).	69
29. Número de ratos mortos e diabéticos, após a aplicação do aloxano (experimento 3).....	70
30. Variação média do peso e constituintes sanguíneos de ratos, em relação à testemunha diabética que recebeu dieta básica (experimento 3).....	72
31. Peso, consumo alimentar e concentração dos constituintes sanguíneos dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina e dieta básica ou modificada (experimento 3).....	72
32. Resumo das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 3).....	73
33. Resumo das análises de covariâncias do peso e constituintes sanguíneos de coelhos diabéticos em função dos tratamentos, ao final do experimento 3.....	74
34. Efeito da alteração de dieta no peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos em ratos diabéticos que não receberam naringenina (experimento 3).	75
1A. Análise de variância da regressão linear simples dos níveis sanguíneos de colesterol, triacilgliceróis e glicose em função da dose, em coelhos, avaliados 4 dias após a aplicação de aloxano (experimento 1).....	102
2A. Teste de pressuposição de paralelismo da análise de covariâncias do peso e constituintes sanguíneos dos coelhos diabéticos em função dos tratamentos, ao final do experimento 1.....	103
3A. Teste de homogeneidade de variância de peso e constituintes sanguíneos de coelhos diabéticos em função dos tratamentos (experimento 1).....	103
4A. Peso e níveis dos constituintes sanguíneos de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina ou farinha de fruta-de-lobo (experimento 1).....	104
5A. Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sanguíneos de coelhos no experimento 1.....	105
6A. Análise de variância da regressão linear simples e peso em função do tempo em coelhos de 4 tratamentos (experimento 1).....	106
7A. Análise de variância da regressão linear simples de triacilgliceróis em função do tempo em coelhos de 4 tratamentos (experimento 1).....	107
8A. Análise de variância da regressão linear simples de colesterol em função do tempo em coelhos de 3 tratamentos (experimento 1).....	108
9A. Peso e concentração dos constituintes sanguíneos de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina (experimento 2).....	109
10A. Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sanguíneos de coelhos no experimento 2.....	110
11A. Análise de variância da regressão linear simples de colesterol em função do tempo em coelhos de 2 tratamentos (experimento 2).....	111
12A. Análise de variância da regressão linear simples de triacilgliceróis em função do tempo em coelhos de 2 tratamentos (experimento 2).....	111

13A.	Análise de variância da regressão linear simples de albumina em função do tempo em coelhos de 4 tratamentos (experimento 1).....	112
14A.	Teste t de comparação de médias entre coelhos diabéticos testemunhas e que receberam naringenina com relação a peso e constituintes sangüíneos (experimento 2).....	112
1B.	Teste t do efeito das dietas básica e modificada no peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos que não receberam aloxano (experimento 1)..	114
2B.	Teste t de peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos, 6 dias após a aplicação de aloxano, em ratos que receberam dieta básica ou modificada (experimento 1).....	115
3B.	Concentração dos constituintes sangüíneos dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta no experimento 1.....	116
4B.	Peso e consumo alimentar dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 1)	117
5B.	Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sangüíneos de ratos no experimento 1.....	118
6B.	Teste de pressuposição das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sangüíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 1)	119
7B.	Correlação momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos ao final do experimento 1.....	119
8B.	Correlação momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos testemunhas normais ao final do experimento 1.....	120
9B.	Correlação momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos testemunhas diabéticos ao final do experimento 1.....	120
10B.	Correlação momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos diabéticos que receberam naringenina ao final do experimento 1.....	121
11B.	Teste t de peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos, 6 dias após a aplicação de aloxano, em ratos que receberam dieta básica e modificada (experimento 2)	121
12B.	Efeito das dietas no peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos que não receberam aloxano	122
13B.	Concentração dos constituintes sangüíneos dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 2)	123
14B.	Peso e consumo alimentar dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 2)	124
15B.	Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sangüíneos de ratos no experimento 2.....	125
16B.	Teste de pressuposição das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sangüíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 2)	126
17B.	Peso, consumo alimentar e concentração dos constituintes sangüíneos dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina e dieta básica ou modificada (experimento 3)	127
18B.	Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sangüíneos de ratos no experimento 3.....	128
19B.	Teste de pressuposição das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sangüíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 3)	129

LISTA DE FIGURAS

1. Ação da insulina em nível molecular.....	3
2. Estrutura básica dos flavonóides.....	16
3. Efeito de doses de aloxano nos níveis sangüíneos de glicose, colesterol e triacilgliceróis em coelhos, 4 dias após a aplicação de aloxano.....	30
4. Correlações lineares simples entre constituintes sangüíneos, 4 dias após a aplicação de aloxano, e ganho de peso em coelhos, 6 dias após aplicação do aloxano.....	31
5. Média dos níveis sangüíneos de triacilgliceróis, colesterol, glicemia e peso em coelhos, no experimento 1.....	33
6. Médias dos níveis sangüíneos de triacilgliceróis, colesterol, albumina, creatinina, glicemia e peso, em coelhos, no experimento 2.....	36
7. Efeito das dietas no consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos sobreviventes, 7 dias após aplicação de aloxano (experimento 1).....	52
8. Médias dos níveis sangüíneos de triacilgliceróis, colesterol, albumina e creatinina, em ratos com dieta básica ou modificada no experimento 1.....	53
9. Médias dos níveis de glicose, peso e consumo alimentar total em ratos alimentando-se de dieta básica ou modificada, no experimento 1.....	54
10. Efeito das dietas no peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos e ratos sobreviventes, 6 dias após aplicação de aloxano no experimento 2.....	62
11. Médias dos níveis sangüíneos de triacilgliceróis, colesterol, albumina e creatinina, em ratos alimentando-se de dieta básica ou modificada no experimento 2.....	63
12. Médias dos níveis sangüíneos de glicose, peso e consumo alimentar em ratos alimentando-se de dieta básica ou modificada, no experimento 2.....	64
13. Médias dos níveis sangüíneos de triacilgliceróis, colesterol, albumina, creatinina, glicose e peso no experimento 3.....	71
1A. Variação da glicemia de coelhos, segundo os tratamentos, naringenina, testemunhas diabética, normal e fruta-de-lobo dos experimento 1 e 2.....	113

CONTEÚDO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Ação da insulina.....	2
2.2. Diabetes.....	4
2.2.1. Origem da diabetes.....	4
2.2.1.1. Diabetes tipo 1.....	4
2.2.1.2. Diabetes tipo 2.....	5
2.2.2. Metabolismo da diabetes.....	6
2.2.3. Terapia da diabetes.....	7
2.2.3.1. Uso de plantas medicinais no controle de diabetes.....	11
2.2.4. Modelo de indução de diabetes em animais.....	13
2.3. Flavonóides.....	15
2.3.1. Absorção de flavonóides.....	17
2.3.2. Efeitos farmacológicos.....	18
2.3.2.1. Ação hipoglicemiante.....	18
2.3.2.2. Na enzima aldose redutase.....	20
2.3.2.3. Como antioxidante.....	20
2.3.2.4. Na peroxidação de lipídios.....	21
2.3.2.5. Em doenças cardiovasculares.....	22
2.3.2.6. Na agregação plaquetária.....	23
2.3.2.7. Na vasodilatação e na atividade antiinflamatória.....	23
2.3.2.8. Na glicosilação.....	24
CAPÍTULO 1.....	25
INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS EM COELHOS E EFEITOS DO FLAVONÓIDE NARINGENINA E FRUTA-DE-LOBO NA HIPERGLICEMIA.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Efeito da dose de aloxano na indução de diabetes em coelhos.....	27
2.2. Efeito do flavonóide naringenina e fruta-de-lobo na glicemia de coelhos diabéticos.....	27
2.2.1. Experimento 1.....	27
2.2.2. Experimento 2.....	27
2.3. Análises estatísticas.....	27
3. RESULTADOS.....	29
3.1. Efeito da dose de aloxano na indução de diabetes em coelhos.....	29
3.2. Efeito do flavonóide naringenina e fruta-de-lobo na glicemia de coelhos diabéticos.....	32
3.2.1. Experimento 1.....	32
3.2.2. Experimento 2.....	35
4. DISCUSSÃO.....	39
4.1. Efeito da dose de aloxano na indução de diabetes em coelhos.....	39
4.2. Efeito do flavonóide naringenina e fruta-de-lobo na glicemia de coelhos diabéticos.....	40
CAPÍTULO 2.....	45
EFEITO DA DIETA E DO FLAVONÓIDE NARINGENINA NA GLICEMIA E OUTROS CONSTITUINTES SANGÜÍNEOS DE RATOS DIABÉTICOS.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1. Experimento 1.....	47
2.2. Experimento 2.....	48
2.3. Experimento 3.....	48
2.4. Análises estatísticas.....	48
3. RESULTADOS.....	50
3.1. Experimento 1.....	50
3.2. Experimento 2.....	60
3.3. Experimento 3.....	69
4. DISCUSSÃO.....	76
5. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICES.....	102

RESUMO

LIBERATO, Selma Coelho, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2001. **Efeito da naringenina e do amido da fruta-de-lobo em animais diabéticos.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Conselheiros: Neuza Maria Brunoro Costa e Tanus Jorge Nagem.

Foi avaliado em coelhos e ratos diabéticos, durante 28 dias, o efeito do flavonóide naringenina no peso e constituintes sanguíneos. Foi ainda avaliado o efeito da farinha da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A.F.C.P. Saint-Hilaire) em coelhos. Diabetes foi induzida através de administração intravenosa de aloxano. A determinação do peso, consumo alimentar e da concentração plasmática de glicose, colesterol, triacilgliceróis, creatinina e albumina foi realizada semanalmente. Nos coelhos, as amostras de sangue foram retiradas do plexo capilar ocular e nos ratos, da extremidade final da cauda.

Visando determinar a dose ideal de aloxano para indução de diabetes em coelhos adultos, machos, da raça Albino Nova Zelândia, realizou-se um experimento, onde os tratamentos constituíram-se de 5 doses de aloxano (90, 105, 120, 135 e 150 mg.kg⁻¹ de peso vivo) e a testemunha (normal), com 8 repetições. Em todos os coelhos, injetou-se 10 mL de glicose, 4, 8 e 12 horas após a administração do aloxano, para evitar hipoglicemia. Aos 4 dias após a aplicação do aloxano, observou-se que as doses de 90 e 105 mg.kg⁻¹ de aloxano causaram menor número de mortes nos animais tratados e propiciaram maior número de sobreviventes diabéticos, sendo então recomendadas para a indução de diabetes em coelhos. Coelhos foram considerados diabéticos quando o nível de glicose sanguínea foi igual ou superior a 180 mg.dL⁻¹. Não houve relação linear entre as doses de aloxano e os níveis sanguíneos de glicose, triacilgliceróis e colesterol, devido a grande variabilidade da resposta dos coelhos a cada dose de aloxano.

Coelhos diabéticos receberam diariamente uma cápsula de 20 mg de naringenina ou de 40 mg de farinha de fruta-de-lobo. Não foi observada diferença significativa, entre os tratamentos aplicados aos coelhos diabéticos.

Em ratos, o diabetes foi induzido com 60 mg.kg⁻¹ de aloxano. Utilizaram-se ratos albinos, machos da raça Wistar, pesando entre 200 e 300 gramas. Estudou-se o efeito de dietas e de flavonóides no peso e constituintes sanguíneos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Foram conduzidos 3 experimentos, nos quais ratos diabéticos

receberam dieta básica (AIN-93G) ou modificada contendo 47,95% de sacarose, com ou sem 20 mg de naringenina diariamente.

Não houve variação no peso, glicemia e nem em outros constituintes sanguíneos avaliados, nos ratos diabéticos, recebendo dieta básica ou modificada, acrescida ou não de naringenina. Os ratos normais que receberam apenas dieta modificada apresentaram maiores ganhos de peso e da glicemia em relação aos que receberam apenas dieta básica, evidenciado apenas em um experimento devido à alta variabilidade das características avaliadas.

Cerca de quarenta dias após o início da administração das dietas, 12 ratos diabéticos que haviam recebido dieta básica sem naringenina, e outros 12 que receberam dieta rica em sacarose foram submetidos à inversão de dietas por 14 dias. Os ratos que passaram a receber dieta básica apresentaram redução do nível de triacilglicerol. Já os ratos que passaram a receber dieta rica em sacarose apresentaram aumento do peso final e do consumo alimentar.

Concluindo, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, nos ratos diabéticos recebendo dieta básica acrescida de naringenina, houve uma tendência a reduzir os níveis de glicose sanguínea e a aumentar o peso comparado a ratos diabéticos sem naringenina.

ABSTRACT

LIBERATO, Selma Coelho, M.S. Universidade Federal de Viçosa, February of 2001. **Effect of naringenin and wolf-fruit in diabetic animals.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Committee members: Neuza Maria Brunoro Costa and Tanus Jorge Nagem.

It was evaluated the effect of the flavonoid naringenin in body weight and blood constituents in diabetic rabbits and rats, for 28 days. In rabbits it was also evaluated the effect of the wolf-fruit (*Solanum lycocarpum* A.F.C.P. Saint-Hilaire). Diabetes were induced by intravenous administration of alloxan. The measurements of the body weight, food consumption and the concentration of plasma glucose, cholesterol, triacylglycerol, creatinin and albumin were measured at weekly intervals. In rabbits, blood was collected from the ocular capillary plexus and in rats, from the end of the tail.

In order to determine the ideal dose of alloxan for diabetes induction in adult male rabbits, Albino New Zealand, 6 alloxan doses of alloxan (0, 90, 105, 120, 135 and 150 mg.kg⁻¹ of live weight, with 8 animals per group) were administered. In all rabbits, 10 mL of glucose was injected, 4, 8 and 12 hours after the administration of the alloxan, to avoid hypoglycemia. Four days later, it was observed that the doses of 90 and 105 mg. kg⁻¹ caused smaller number of deaths in the treated animals and resulted in larger number of diabetic survivors. Therefore, these doses were recommended for induction of diabetes in rabbits, in future experiments. Rabbits were considered diabetics when the levels of blood glucose were equal or greater than 180 mg.dL⁻¹. There was no linear relationship among the alloxan doses and the blood levels of glucose, triacylglycerol and cholesterol, due to great variability of the response of the rabbits to each alloxan dose.

Diabetic rabbits received a daily dose of 20 mg of naringenin or 40 mg of fruit-of-wolf flour. No significant difference was observed among the treatments applied to the diabetic rabbits.

Diabetes was induced using 60 mg.kg⁻¹ alloxan in albino Wistar males rats weighing between 200 and 300 g. It was studied the effect of diets and of flavonoids in body weight and blood constituents. The experimental design was entirely randomized. Three experiments were carried out, in which, diabetic rats, received basal (AIN-93G) or modified diet with 47.95% of sucrose, with or without 20 mg of naringenin daily.

No difference was observed in body weight, glycemia and other blood constituents in diabetic rats, receiving basal or modified diet, with or without added naringenin. The normal rats that received modified diet showed body higher weight gain and glycemia in relation to those that received basal diet, however, it was evidenced in only one experiment due to the high variability of the characteristics evaluated.

After 40 days in their diets, 12 diabetic rats that received basal diet without naringenin and 12 that received diet rich in sucrose were crossed over and maintained in their diets for another 14 days period. The rats that changed to basal diet presented reduction on triacylglycerol levels. The rats that changed to rich in sucrose diet presented an increase on final body weight and food consumption.

In conclusion, although no significant difference has been observed among treatments, diabetic rats receiving basal diet with added naringenin showed a trend lowering blood levels of glucose and increased body weight compared to diabetic rats without naringenin.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O diabetes acomete atualmente milhões de pessoas em todo o mundo e, no Brasil, 10% da população adulta (cerca de 6 milhões de pessoas). A doença constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade em diferentes grupos etários da população (FOSS, 1989). Estima-se que a metade dos indivíduos portadores da doença desconhecem sua condição. Muitos somente serão identificados como tal quando apresentarem uma complicação crônica da doença. Estima-se ainda, que cerca de 20% dos doentes que têm esse conhecimento não realizam quaisquer tratamentos.

O diabetes é um conjunto de desordens metabólicas resultantes da insuficiência de insulina ou de fatores que interferem na ação desse hormônio. Para a convivência com essa doença, há necessidade de um rigoroso controle da glicemia, uma vez que ainda não apresenta cura (ENSMINGER et al., 1994).

Antes do advento da insulina exógena e hipoglicemiantes orais, a principal forma de controle do diabetes envolvia o uso de plantas medicinais. Grande parte da população mundial ainda utiliza plantas *in natura* ou seus extratos como forma alternativa de terapia. Mais de 400 espécies vegetais têm sido citadas como benéficas no controle do diabetes (GRAY & FLATT, 1999).

A fitoterapia com frutos de *Solanum lycocarpum* St. Hills tem sido amplamente utilizada no controle do diabetes e visando reduzir a obesidade e o nível de colesterol sanguíneo (DALL'AGNOL & POSER, 2000). A planta é freqüentemente confundida com *Solanum grandifolium*. Ambas são popularmente conhecidas como fruta-de-lobo, lobeira, jurubebão, juripeba, baba-de-boi, entre outros (CORREA, 1984).

Os flavonóides são um grande grupo de compostos polifenólicos de origem vegetal, que têm apresentado diferentes efeitos biológicos, tais como: antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, antialérgico, com ações vasodilatadoras, inibição da peroxidação de lipídios, da agregação plaquetária, da permeabilidade capilar e da atividade de algumas enzimas, tais como a ciclo-oxigenase e a lipoxigenase (SORENSEN et al., 1994). Os flavonóides são promissores fármacos naturais. A aplicação do antiinflamatório Daflon 500[®], um medicamento contendo uma fração de flavonóides purificados, (90% de diosmina e 10% de hesperidina) reduziu a hiperglicemia em ratos diabéticos (JEAN & BODINIER, 1994).

Formulações contendo extrato de plantas e preparações minerais com ação hipoglicemiante quando usadas em conjunto com os medicamentos hipoglicemiantes orais, tolbutamida ou glibenzamida, proporcionam reduções substanciais nos níveis de glicose sanguínea em coelhos diabéticos. O uso daquelas poderá permitir a redução da dose desses medicamentos e seus efeitos colaterais (SUNDARAM et al., 1996).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito hipoglicemiante do amido da fruta-de-lobo e do flavonóide naringenina em coelhos e ratos com diabetes induzido por aloxano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O principal carboidrato presente nos alimentos é o amido, seguido dos dissacarídeos sacarose e da lactose. Enzimas específicas, amilases (presentes na saliva e estômago), sacarase, lactase, entre outras (presentes nas células da mucosa do intestino delgado), desdobram o amido e os dissacarídeos nos monossacarídeos glicose, frutose e galactose, que são absorvidos no intestino e, através do sistema porta, atingem o fígado (BRODY, 1993). Os hepatócitos são livremente permeáveis aos monossacarídeos, não dependendo de insulina para o transporte da glicose. No entanto a glicose é absorvida principalmente via ativa, envolvendo fosforilação catalisada por hexoquinase e glicocinase, com formação de glicose-6-fosfato, o que impede que essa hexose saia livremente da célula (BONDY, 1969; MARZZOCO & TORRES, 1999). A frutose e a galactose, por fosforilação e modificações enzimáticas, se transformam, em sua quase totalidade, em glicose-6-fosfato (MARZZOCO & TORRES, 1999).

No fígado, a glicose-6-fosfato pode ser convertida a glicogênio ou revertida à glicose e ser exportada, via corrente sangüínea, para o resto do organismo, onde será absorvida pelas células com a intermediação da insulina. A glicose pode ser convertida em glicogênio, no tecido muscular, ou em gordura na forma de triacilgliceróis, no tecido adiposo, para armazenamento; servir de fonte de esqueletos de carbono ou ser oxidada para produção de energia para a célula (MARZZOCO & TORRES, 1999).

2.1. Ação da insulina

A insulina é uma proteína, formada por 51 aminoácidos organizados em 2 cadeias polipeptídicas. É secretada pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, em resposta à hiperglicemia (MARZZOCO & TORRES, 1999).

A ação do hormônio insulina inicia-se pela sua ligação aos receptores, que consistem de glicoproteínas localizadas nas membranas plasmáticas das células (SMITH et al., 1988). A insulina estimula o transporte de glicose para dentro dos tecidos muscular e adiposo, por promover a translocação de transportadores de glicose (glicoproteínas) intracelulares para a membrana. Tal efeito é reversível. Os transportadores retornam para o interior celular após a liberação da insulina. A fosforilação da glicose garante sua difusão facilitada para dentro das células (DAVIS & GRANNER, 1996).

A união da insulina aos seus receptores tirosina quinases, na membrana celular, estimula a atividade de proteína quinase, intrínseca ao próprio receptor, específica para resíduos de tirosina (MARZZOCO & TORRES, 1999). O primeiro passo seguindo esta ativação, consiste em autofosforilação do receptor, tornando-se ativo e desencadeando a fosforilação de vários substratos intracelulares (KAHN, 1998). Os mais estudados destes substratos são proteínas de alto peso molecular, substrato-receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1 e IRS-2). Essas

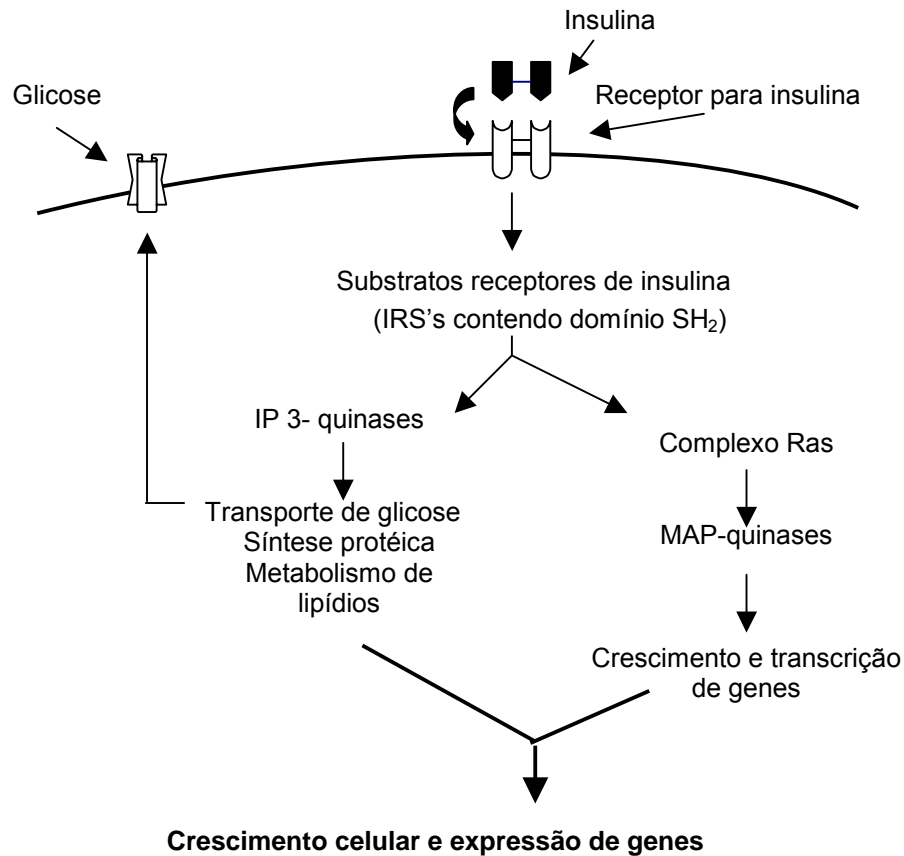


Figura 1 – Ação da insulina em nível molecular (adaptado de KAHN, 1998)

proteínas fosforiladas servem como sítios de ligação e ativação de outras proteínas intracelulares contendo domínio SH₂ e estimulam a insulina através de 2 principais seqüências de reações intercelulares em cascatas: uma é a via mediada pela fosfatidilinositol 3-quinase (IP 3-quinase) e a outra é a via da proteína Ras. IRS-1 e IRS-2 são um ponto importante de divisão da sinalização da insulina e representa vários pontos potenciais de regulação de doenças (KAHN, 1998; WHITE & KAHN, 1994) (Figura 1). Em alguns pacientes com diabetes tipo 2, a expressão do gene Rad, que codifica a proteína Ras, que inibe a captação de glicose estimulada por insulina, é elevada no músculo esquelético (KAHN, 1998).

A insulina também promove a deposição de glicogênio por estimular a atividade da glicogênio sintase, enzima limitadora da taxa da síntese de glicogênio, e por inibir a glicogênio fosforilase, enzima limitadora da taxa de degradação do glicogênio (MARZZOCO & TORRES, 1999).

No adipócito, a glicose destina-se à síntese dos triacilgliceróis (MARZZOCO & TORRES, 1999). A insulina promove a penetração dos ácidos graxos livres que irão se combinar com o glicerol para formar triacilgliceróis. Por outro lado, a insulina impede a fragmentação dos triacilgliceróis, isto é, possui uma ação antilipolítica. Esta ação é exercida através da inibição da adenilato ciclase, impedindo a lipólise mediada pelo cAMP (MARZZOCO & TORRES, 1999). A insulina também inibe a atividade da lipase dos adipócitos, enzima que hidrolisa os triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (MARZZOCO & TORRES, 1999).

2.2. Diabetes

A diminuição na produção de insulina ou na sensibilidade das células-alvo a este hormônio provoca o diabetes mellitus, que é um grupo de síndromes caracterizadas por hiperglicemia; metabolismo alterado de lipídios, carboidratos e proteínas; e aumento do risco de ocorrência de doença vascular.

Existem 2 tipos de diabetes mellitus:

- Diabetes mellitus insulino dependente (IDDM) ou diabetes tipo 1: Ocorre antes dos 25 anos de idade. O organismo humano produz pouca ou nenhuma insulina, sendo dependente de insulina exógena para prevenir cetoacidose e morte. Há cetose proeminente, sudorese, poliúria, polifagia, polidipsia e acidose;

- Diabetes mellitus não insulino dependente (NIDDM) ou diabetes tipo 2: Ocorre geralmente por volta de 40 anos de idade. A hiperglicemia resulta principalmente da diminuição de secreção de insulina, podendo ser causada também pela menor eficiência de sua ação. Neste último caso, o nível de insulina endógena pode ser normal ou elevado, mas é inadequado para sobrepujar a resistência tecidual a sua ação. Os indivíduos podem ou não experimentar os sintomas clássicos do diabetes e, normalmente, não desenvolvem cetoacidose, exceto durante períodos de estresse severo. Em geral, não há requerimento de insulina. O controle, na maioria dos casos, é possível por dieta, hipoglicemiantes orais e atividade física. Ocorre em 90% dos casos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1994; BARRANCO, 1998).

2.2.1. Origem do diabetes

2.2.1.1. Diabetes tipo 1

A etiologia do diabetes tipo 1 ainda não está bem definida. Causas genéticas, resposta auto-imune das células T e viroses têm sido relacionados na iniciação e progressão dessa doença (VON HERRATH et al., 1995).

Segundo BAEZA et al. (1996), em camundongos geneticamente modificados, existe correlação entre a expressão do gene Reg, no pâncreas, e a probabilidade de desenvolvimento de diabetes. Segundo OHNO & NAMIKAWA (1996), em mamíferos insetívoros, a incidência de animais glicosúricos foi maior nos machos.

LANG et al. (1977) sugeriram que a doença pode ser infecciosa. A inoculação em porquinhos-da-índia sadios, de um agente etiológico isolado de animais com diabetes, reproduziu a doença. O aumento na incidência do diabetes tipo 1 em diversos países pode estar sendo causada por uma mudança epidemiológica das infecções por enterovírus, um dos maiores causadores de disfunções celulares. A razão é que uma grande porção de crianças e fetos são infectados durante o período em que carecem de anticorpos do organismo materno e portanto tornam-se vulneráveis a complicações como meningite, disfunções celulares ou autoimunidade da célula β . Sugere-se 2 mecanismos: 1) diminuição dos níveis de anticorpos em mulheres grávidas, fazendo com que o feto e 2) o recém-nascido careçam de proteção e que as crianças entrem em contato com o enterovírus mais tarde, quando já não há mais anticorpos maternos para protegê-las (VISKARI et al., 2000). As infecções a enterovírus são um fator de risco importante de diabetes tipo 1 e são associadas à auto-imunidade da célula β

vários anos antes do surgimento dos sintomas. O vírus Coxsackie B pode iniciar o processo de dano autoimune (ANDRÉOLETTI et al., 1998; LONNROT et al., 2000).

Muitos estudos associam causas imunológicas à doença. Em 85% dos pacientes com diabetes tipo 1, estão presentes anticorpos contra pelo menos um antígeno da célula β (BAEKESKOV et al., 1982). Citocinas, por meio de sinais nas ilhotas, atraem espécies reativas de oxigênio citotóxicas, gerando macrófagos e linfócitos, os quais destroem as células β sensíveis às espécies reativas de oxigênio (KUBISCH et al., 1997; ZARZUELO et al., 1996). Camundongos transgênicos apresentaram maior resistência a diabetogênese induzida por aloxano, talvez porque a variação genética no metabolismo de espécies reativas de oxigênio possa afetar a diabetogênese mediada por estresse oxidativo (KUBISCH et al., 1997).

A síndrome do diabetes tem muitas características de auto-imunidade, as quais incluem: infiltração das ilhotas pancreáticas por células mononucleares (insulinite), por exemplo macrófagos; presença de anticorpos circulando entre as células das ilhotas; e a transferência de insulinite e diabetes com células mononucleares ativadas, de ratos geneticamente modificados, evidenciando a participação dos macrófagos na destruição das células β (WU & FLYNN, 1993), assim como ocorre no diabetes induzido por estreptozotocina (ROSSINI et al., 1977).

A administração oral de auto-antígeno específico para tecido pancreático pode prevenir o diabetes auto-imune espontânea (ARAKAWA et al., 1998). Um peptídeo hormonal (Facteur thymique sérique), utilizado no tratamento de doenças auto-imune em humanos, preveniu a hiperglicemia em ratos quando injetado em doses de 40 a 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 1 minuto antes da injeção de aloxano (YAMANOUCHI et al., 1994).

A falta de uma resposta protetora em células de ilhotas de ratos diabéticos, mas não em ratos resistentes ao diabetes, pode promover a lise das células β e liberação de auto-antígeno (BELLMANN et al., 1997). As imunidades humoral e celular estão envolvidas no diabetes tipo 1. Existem alguns auto-antígenos reconhecidos pelas células T do tecido pancreático (ARAKAWA et al., 1998).

O macrófago mata a célula β pancreática de ratos *in vitro* através da geração de NO (óxido nítrico), via ciclo arginina-citrulina (WU & FLYNN, 1993). Em uma condição auto-imune há ativação do ciclo em macrófagos (WU & FLYNN, 1993). O aumento da síntese de L-arginina, a partir de L-citrulina, mantém elevadas sua concentração intracelular e geração prolongada de NO tanto em macrófagos de ratos geneticamente modificados diabéticos, ou predispostos a desenvolver diabetes (WU & FLYNN, 1993), quanto nas glândulas gástricas de coelhos com diabetes (CONTRERAS, 1997). L-arginina é um precursor potente do vasodilatador NO, que é sintetizado pelas células da mucosa gástrica para manter sua integridade (CONTRERAS, 1997).

Em pacientes tratados durante longos períodos com insulina exógena, pode surgir resistência à mesma. A insulina pode atuar como antígeno, neutralizando anticorpos. O soro de porcos e outros animais, recebendo insulina por períodos prolongados, quando injetado em camundongo simultaneamente à insulina anulou o seu efeito hipoglicemiante. Camundongos tornaram-se diabéticos por injeção de anti-soro de insulina de porco (MOLONEY & COVAL, 1955).

2.2.1.2. Diabetes tipo 2

O mecanismo para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 a partir da obesidade é desconhecido. A obesidade leva à resistência à insulina e a normoglicemia é mantida por

hiperinsulinemia até que as células β tornam-se incapazes de atender à maior demanda de insulina, iniciando-se o diabetes (SHIMABUKURO et al., 1998).

Ratos obesos geneticamente modificados, diabéticos e predispostos a desenvolver diabetes apresentaram níveis elevados de ácidos graxos no plasma, hiperplasia 4 vezes maior e perda de mais de 50% de células β . Ratos obesos diabéticos apresentaram ruptura de células β induzida pelo aumento do nível de ácidos graxos livres, via síntese de novo da formação de ceramida, e maior produção de NO. A ceramida contém ácidos graxos de cadeia longa, sendo responsável pela tradução do sinal dessa ruptura (SHIMABUKURO et al., 1998).

Em pacientes com diabetes tipo 2, a falta de liberação de insulina induzida por glicose é atribuída a um defeito na sensibilização à glicose por células β -pancreáticas. Em células β de ratos, o mecanismo de regulação de glicose requer um catabolismo intracelular de açúcar, com uma etapa crítica em nível de glicoquinase, mas não em nível do receptor GLUT2, localizado na membrana celular (VOS et al., 1995).

2.2.2. Metabolismo no diabetes

Diversas desordens metabólicas ocorrem em pacientes com diabetes, manifestando-se por hiperfagia, glicosúria, proteólise aumentada, cetose e acidose, com ou sem hiperlipidemia (IYER et al., 1992). Coelhos diabéticos apresentaram aumento da deposição de lipídios mediada por macrófagos, injúria endotelial e aumento progressivo de dano da aorta (RICHARDSON et al., 1995).

O diabetes altera a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, o tônus vascular, o metabolismo de carboidratos, estando também associada à peroxidação de lipídios e à geração de radicais livres.

A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ troca Na^+ por K^+ , gerando gradientes eletroquímicos que são essenciais para o transporte de água e eletrólitos através da membrana celular (BUSIK et al., 1997). A hiperglicemia induz à redução na atividade dessa enzima (GUPTA et al., 1996; GUPTA et al., 1992a) nas células do ducto pancreático (BUSIK et al., 1997), na córnea (HERSE & ADAMS, 1995) e na artéria carótida de coelhos diabéticos (TESFAMARIAM et al., 1993). O diabetes aumenta as concentrações de Na^+ intracelular (GUPTA et al., 1996; GUPTA et al., 1992a).

As atividades da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e da ATPase estimuladas por Ca^{++} foram reduzidas, 10 dias após administração de aloxano. A atividade de troca de Na^+ e Ca^{++} e a captação de Ca^{++} dependente de ATP foram reduzidas em sarcolemas de corações, 2 semanas após a indução de diabetes. Essas alterações, passíveis de serem normalizadas com administração de insulina, podem provocar uma sobrecarga de Ca^{++} intracelular, durante o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética (GOLFMAN et al., 1998). O acúmulo de Ca^{++} e Mg^{++} no miocárdio foram grandemente associados a sarcolemas danificados em coelhos diabéticos (BHIMJI & McNEILL, 1989).

A hiperglicemia reduz a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ no nervo e o tecido vascular sofre uma depleção de mioinositol celular, aumentando o fluxo através da via aldose redutase e alteração da proteína quinase (GUPTA et al., 1992a). Mioinositol, um constituinte de plantas e animais, é essencial para manter a integridade da membrana. Os metabólitos do mioinositol agem como mensageiros secundários na regulação da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ mobilizando Ca^{++} intracelular e ativando proteína quinase C. Na hiperglicemia há redução de mioinositol devido à inibição competitiva entre glicose e mioinositol no sistema de transporte específico dependente de Na^+ . A redução de mioinositol também se deve a um aumento da atividade do sorbitol desidrogenase, que transforma sorbitol em D-frutose (ZENON et al., 1990).

Em diabéticos observa-se enfraquecimento do tônus vascular. Altas concentrações de glicose promovem redução da vasodilatação, maior vasoconstrição, hiperplasia de células musculares lisas e remodelamento vascular (COSTA E FORTI & FONTELES, 1998). Há redução na liberação de óxido nítrico, que é um dos fatores de liberação do endotélio que promove o relaxamento vascular (GUPTA et al., 1992a).

O diabetes causa alterações no metabolismo de carboidratos. Como complicação secundária ocorre metabolismo anormal de glicoproteínas (IYER et al., 1992).

Glicosilação (ou glico-oxidação) não enzimática ou reação de Maillard é a reação entre o grupo amino livre de proteínas e o grupo carbonil da glicose, levando à formação de frutosaminas e cetoaminas (MORIMITSU et al., 1995). Hiperglicemia resulta em glicosilação não enzimática de várias proteínas *in vivo*, a qual contribui para perda de sua elasticidade (JAIN et al., 1989). Proteínas como o cristalino, a albumina, a apoproteína B de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), o colágeno e a hemoglobina podem reagir com açúcares promovendo desidratação, rearranjo estrutural, ligações e reações de polimerização gerando produtos finais de glicosilação (WOLFF & DEAN, 1987). Nos capilares sangüíneos, inclusive os dos glomérulos renais, proteínas plasmáticas são seqüestradas pela membrana basal glicosilada. Esse mecanismo contribui para o espessamento e aumento da permeabilidade dos capilares glomerulares, caracterizando a nefropatia diabética (GUPTA et al., 1992a).

Reações de auto-oxidação de moléculas como glicose e vitamina C, catalisadas por pequena quantidade de metais de transição livre como ferro e cobre, são uma fonte poderosa de radicais livres de oxigênio, que aceleram a formação de produtos de glicosilação avançada, os quais se transformam em suprimento para os radicais livres de oxigênio, iniciando o processo auto-oxidativo de glicosilação. O déficit neurovascular de metais de transição pode elevar a atividade de radicais livres, via peroxidação de lipídios, causando um dano cumulativo crônico nas fibras nervosas (CAMERON & COTTER, 1995).

Elevados níveis de glicose causam peroxidação de lipídios da membrana do eritrócito e aumento de sua fragilidade osmótica (JAIN, 1989), acarretando dano e maior estresse oxidativo (MIYAKE et al., 1998). A peroxidação de lipídios foi também observada nos eritrócitos (GUPTA et al., 1992b).

Há aumento do nível de malonaldeído, devido à peroxidação de lipídios, no tecido e sangue de ratos diabéticos, o qual pode favorecer o aumento da produção de radicais livres de oxigênio, que atacam os ácidos graxos nas membranas celulares e causam peroxidação de lipídios (MIYAKE et al., 1998). A peroxidação de lipídios tem função importante na carcinogênese (MIYAKE & SHIBAMOTO, 1997). Especula-se que o dano oxidativo pode ocorrer no DNA durante a quebra peroxidativa de membranas de ácidos graxos poliinsaturados (MIYAKE et al., 1998).

2.2.3. Terapia do diabetes

A terapia objetiva a normalização da glicemia e de todos os aspectos do metabolismo. Essa normoglicemia pode ser conseguida em pacientes com diabetes tipo 1, por meio de múltiplas doses diárias de insulina. Adicionalmente, o tratamento requer conduta coordenada de plano alimentar e atividade física. O objetivo é alcançar uma concentração sangüínea de glicose, em jejum, em níveis do não diabético, entre 70 e 110 mg.dL⁻¹ e um valor pós-prandial até 2 horas após inferior a 150 mg.dL⁻¹ (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1994; ALMEIDA, 1997; DAVIS & GRANNER, 1996).

O controle do diabetes tipo 2 é obtido muitas vezes, apenas, por plano alimentar e atividade física. Associados a isso, diversos agentes farmacológicos que estimulam a liberação de insulina são empregados em seu tratamento (BARRANCO, 1998).

As drogas antidiabéticas incluem insulina, sulfoniluréias, biguanidas, tiazolinedionas, inibidores da absorção de carboidrato, glinidas e análogos da insulina (PALUMBO, 1999; SHINKAI, 1999).

As sulfoniluréias têm sido frequente e extensivamente usadas no controle do diabetes tipo 2 (PALUMBO, 1999), aumentando a função da célula β , mas não atacam a resistência à insulina. O tratamento convencional com compostos a base de sulfoniluréia aumentam os níveis de insulina plasmática, reduzindo sua depuração hepática (DAVIS & GRANNER, 1996) e, estimulando a liberação de insulina do pâncreas por meio do bloqueio dos canais de K^+ dependente de ATP, despolarização da membrana e influxo de Ca^{++} através dos canais de Ca^{++} sensíveis à voltagem (DAVIS & GRANNER, 1996; SUNAGA et al., 1999). O estímulo das células β aumenta seu estresse, e a função destas células diminui inexoravelmente. A glibenclamida, uma sulfoniluréia, reduz primariamente os níveis de glicose em jejum; não reduz as flutuações diárias da glicose; aumenta acentuadamente a exposição total à insulina e, conseqüentemente tem um grande potencial hipoglicemiante (HOLLANDER et al., 2000). Em coelhos diabéticos, a gliclazida, outra sulfoniluréia, inibiu a aterosclerose, sugerindo que, além da ação hipoglicemiante, tenha benefícios em indivíduos com doenças vasculares (PAGANO et al., 1998).

O mecanismo de ação das biguanidas baseia-se em: redução da absorção intestinal da glicose (efeito semelhante é causado pelos inibidores da α -glicosidase), que parece ser seu principal modo de ação, estímulo da glicólise anaeróbia e inibição da neoglicogênese. Metformina e fenformina são representantes das biguanidas. A primeira é anti-hiperglicêmica, provocando aumento na ação da insulina nos tecidos periféricos e redução no débito hepático de glicose devido à inibição da gliconeogênese (DAVIS & GRANNER, 1996). A metformina, única biguanida aprovada no tratamento do diabetes tipo 2 nos Estados Unidos, reduz a glicose plasmática efetivamente em jejum, entretanto, tem pouca influência no período de refeição (PALUMBO, 1999). Além das propriedades antihiperglicêmicas, a metformina apresenta efeitos na redução de lipídios, provavelmente devido a diminuição das concentrações plasmáticas de triacilgliceróis como resultado da diminuição da síntese hepática de VLDL, correlacionada à secreção reduzida de lipoproteína (PALUMBO, 1999).

As tiazolinedionas ou glitazonas incluem: troglitazona, pioglitazonas, rosiglitazonas e ciglitazonas. São uma classe de agentes sensibilizadores de insulina, com ação via ativação do receptor nuclear e subsequente alteração na expressão dos genes envolvidos no metabolismo dos lipídios e carboidratos (MATTHEWS, 1999). As tiazolinedionas agem no foco do problema do paciente com diabetes tipo 2: a resistência insulínica, diminuindo-a, sensibilizando as células dos tecidos periféricos para melhorar a ação dos mesmos (FRAIGE FILHO, 2000a). As tiazolidinadionas parecem aumentar a ação da insulina em animais insulino-resistentes, devido ao aumento do número de transportadores de glicose (DAVIS & GRANNER, 1996). Reduz a glicose plasmática pós-prandial e em jejum no diabetes tipo 2 afetando a glicose hepática em jejum e a sensibilidade periférica à insulina (SHINKAI, 1999). Entretanto, 20 a 30% dos diabéticos não respondem a troglitazona e em 2% dos pacientes houve toxicidade ao fígado (SUBRAMANIAM, 1999). A troglitazona foi recentemente aprovada e liberada para tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 em tratamento com insulina, para melhorar o controle glicêmico (PALUMBO, 1999). Entretanto, a pedido do FDA (Food and Drug Administration), a troglitazona foi retirada do mercado devido aos seus efeitos colaterais, responsável por vários casos de intoxicação hepática grave.

A pioglitazona, uma outra tiazolinedionas, além de reduzir a glicemia de jejum e hemoglobina glicosilada (ARONOFF et al., 2000), ajuda também a estabelecer o equilíbrio nas anormalidades lipídicas reduzindo os triacilgliceróis e elevando as lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL) (KEMNITZ et al., 1994, SATO et al., 1995; ARONOFF et al., 2000). Nenhum efeito tóxico foi observado em macacos recebendo diariamente 3 mg.kg⁻¹ durante 2 semanas (KEMNITZ et al., 1994) ou em pacientes com diabetes tipo 2 recebendo 45 mg diariamente durante 26 semanas (ARONOFF et al., 2000).

A administração de 8 mg.dia⁻¹ de rosiglitazona a pacientes com diabetes tipo 2 proporcionou redução da glicemia e hemoglobina glicosilada (SHINKAI, 1999). Não houve efeitos adversos sobre a estrutura e a função cardíacas nem sobre os lipídios sanguíneos após 100 semanas de tratamento (SALZMAN et al., 2000).

Uma outra classe de hipoglicemiantes orais são as glinidas, que incluem as repaglinida e as nateglinidas. Tem mecanismos de liberação de insulina, mimetizando os picos pós-prandiais desse hormônio (FRAIGE FILHO, 2000a). A repaglinida, já aprovada pelo FDA, tem início mais rápido e tempo de ação mais curto do que os agentes estimulantes convencionais da célula β . Causa episódios hipoglicêmicos significativamente menos severos em comparação com sulfoniluréia (SHINKAI, 1999). A repaglinida tem mecanismo de ação, em parte, similar ao da sulfoniluréia: a liberação de insulina das células pancreáticas é estimulada pelo fechamento dos canais de potássio dependente de ATP. Entretanto, a repaglinida regula estes canais através de um sítio de ligação à célula β distinto da glibenglamida, e a substância não causa liberação de insulina na ausência de glicose. É excretada pelo fígado e bile, sendo um medicamento promissor para pacientes com função renal reduzida (WOLFFENBUTTEL, 1999).

A nateglinida tem mostrado restaurar de maneira única o padrão fisiológico da secreção da insulina que está desaparecido nos pacientes diabéticos, e de reduzir marcadamente as variações de glicose no período da refeição. Aumenta preferencialmente a liberação precoce de insulina, reduz as flutuações amplas da glicose características do diabetes tipo 2, e tem efeitos na redução dos níveis de glicose de jejum e pós-prandial em animais, voluntários saudáveis e pacientes com diabetes tipo 2 (DUNN & FAULDS, 2000). Tem efeito inibitório nos canais de K⁺ mais rápido, entretanto, menos potente que repaglinida (HU et al., 2000).

Acarbose, um inibidor de α -glicosidases, enzimas que são responsáveis pela absorção dos carboidratos, localizados na borda em escova dos enterócitos do intestino delgado, funciona como falso carboidrato, substituindo os substratos naturais das α -glicosidases. Inibe a atividade dessa enzima de modo potente: sua afinidade pelas α -glicosidases é 15000 vezes superior à da sacarose; de modo competitivo: sua ligação no local de ação dá-se por competição com os carboidratos; e de modo reversível: sua degradação total assegura a liberdade nos locais das enzimas. A acarbose reduz os níveis pós-prandiais de glicemia, melhora a glicemia de jejum, face ao melhor controle glicêmico, e conseqüentemente a hemoglobina glicosilada. Melhora também a sensibilidade à insulina, a dislipidemia e diminui a insulinemia, elevando os níveis do enterormônio GLP1, que proporciona: redução dos níveis de glicagon, retardo do esvaziamento gástrico, aumento da saciedade, diminuição da ingestão calórica, diminuição dos níveis de insulinemias pós-prandiais e redução de 21,8% do colesterol total e LDL (FRAIGE FILHO, 2000b).

A insulina é obtida do pâncreas de suínos ou elaborada de forma quimicamente idêntica à insulina humana, através de tecnologia de recombinação do DNA ou modificação química da insulina de suínos. Foram desenvolvidas insulinas análogas através da modificação da seqüência do aminoácido da molécula de insulina. A insulina é comercializada nas formas

de ação rápida (lispro), curta, intermedária e longa. A insulina lispro tem início de ação mais rápido, efeito hipoglicemiante com pico precoce e duração menor. Permite maior controle da glicemia nas primeiras 3 a 4 horas após as refeições (BASTYR et al., 1999). Dentre os análogos de insulina de ação rápida, além das lispro, existe o aerosol de insulina que é absorvida a nível pulmonar. Entretanto, alguns estudos demonstraram biodisponibilidade e bioeficiência inferiores a 8% da insulina biossintética inalada relativa a insulina endovenosa ou subcutânea (HEINEMANN et al., 2000a). Entretanto, associada a um intensificador de absorção, após a inalação da insulina, o início de ação foi substancialmente mais rápido do que após a aplicação subcutânea e a ação máxima foi alcançada mais cedo (KLAPPOTH et al., 1999).

Dentre os análogos de insulina de ação lenta, inclui-se a glargina que não tem pico evidente e tem efeito contínuo por 24 horas, imitando a secreção basal fisiológica (FRAIGE FILHO, 2000a). A insulina glargina, aprovada pelo FDA em abril de 2000, é uma insulina recombinante humana com modificação no ponto isoelétrico que produz um atraso no nível de absorção e um aumento na duração de ação imitando a secreção de insulina. Proporciona menor risco de hipoglicemia noturna severa (BOLLI & OWENS, 2000).

A descoberta de uma proteína com homologia de seqüência com insulina animal em tegumentos (cascas) das sementes de feijão-de-porco, em folhas de pata-de-vaca e em frutos de feijão-de-corda e que têm ação insulínica sobre os animais diabéticos, sugere fortemente que esse hormônio esteja presente em vegetais. A constatação da presença de insulina em plantas, pode significar que a utilização de remédios populares feitos a base de vegetais para o tratamento do diabetes possa ser validada cientificamente (OLIVEIRA et al., 2000).

O peroxovanádio, aplicado através da pele, pode reduzir a glicemia em ratos diabéticos. Uma variedade de compostos formados por vanádio têm apresentado efeito hipoglicemiante, embora por pequeno período de tempo (BRAND & HAMEL, 1999). O peroxovanádio promove a captação de glicose aumentando a autofosforilação dos receptores de insulina, prevenindo sua desfosforilação (SHISHERA et al., 1993). Porém, pesquisas sobre a toxicidade dos sais de vanádio sugerem limitações nas aplicações clínicas futuras (DRAKE & POSNER, 1998).

Outra perspectiva de terapia é o uso de alimentos transgênicos. Batatas geneticamente modificadas contendo 30 µg de insulina foram produzidas. Quando fornecidas a camundongos, a incidência de diabetes foi menor. Administração oral de auto-antígeno específico para tecido pancreático pode levar a prevenção de diabetes auto-imune espontânea (ARAKAWA et al., 1998).

O monitoramento da glicemia preciso e freqüente é ideal. Pode ser realizado através de método invasivo, onde há contato mecânico com tecido ou fluido fisiológico (sangue, plasma, fluido intersticial) ou não-invasivo, onde o fluido fisiológico (saliva, urina, lágrima, suor) é obtido sem intervenção mecânica. A determinação da concentração da glicose é realizada através de propriedades características (espectro, temperatura, óptica, eletro-magnética, dentre outras) da glicose. O sensor de glicose óptico se baseia em reações enzimáticas (biosensores ópticos), na ligação antígeno-anticorpo (imunossensores ópticos) (WILKINS & ATANASOV, 1996), ou no coeficiente de deflexão da pele humana, onde a quantidade de luz refletida é registada através de sensores ópticos (HEINEMANN, L. et al., 2000b).

O sensor eletroquímico, mais comumente utilizado, se baseia na eletro-oxidação direta da glicose. Os biosensores combinam algum sinal físico com componente ativo biologicamente (enzima, anticorpos, células, tecidos ou microorganismos). A maioria dos biosensores de glicose normalmente se baseiam na enzima glicose oxidase. O monitoramento da glicose pode ser intermitente, quando as amostras são coletadas do paciente ou contínua,

quando há um contato intermediário com o fluido *in vivo* (WILKINS & ATANASOV, 1996). Nos Estados Unidos, o FDA aprovou, em fevereiro de 1999, um sistema de monitoramento contínuo da glicose, contendo um sensor que quantifica e registra a glicose do fluido intersticial a cada 5 minutos (GINSBERG, 1999).

As primeiras fitas para determinação das glicemia capilar surgiram em 1976 (Dextrostix). Pouco depois, a monitorização laboratorial possibilitou as determinações das hemoglobinas glicosiladas (que mostra a média da glicemia nos últimos 60 dias anteriores à coleta da amostra do sangue) e das frutossaminas (indicadoras da média da glicemia nos 21 dias anteriores à coleta) (OLIVEIRA, 1999).

A medição da fluorescência das lentes ópticas de forma não invasiva, permite determinar a probabilidade do indivíduo sofrer de diabetes. O instrumento detecta resíduos de glicosilados avançados elevados no cristalino do paciente. Estes resíduos de glicosilação desenvolvidos com maior rapidez em pacientes com níveis elevados de glicose, podem ser usados para distinguir os pacientes diabéticos (BERGENSTAL et al., 2000).

2.2.3.1. Uso de plantas medicinais no controle do diabetes

Plantas medicinais são importante fonte de substâncias potencialmente terapêuticas e têm sido utilizada no controle do diabetes mellitus, em muitos países (ZIYYAT et al., 1997; COX & BALICK, 1994). Alguns de seus princípios ativos agem aumentando a liberação de insulina, modificando o metabolismo da glicose, inibindo fatores hiperglicemiantes, inibindo ou estimulando a síntese de enzimas ou atenuando as complicações do diabetes. Dentre os princípios ativos antidiabéticos tem-se: polissacarídeos, proteínas, esteróides, terpenóides, alcalóides, flavonóides, glicosídeos, triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (IVORRA et al., 1989; RAHMAN & ZAMAN, 1989; ABDEL-HASSAN et al., 2000; LAMELA et al., 1986).

Dentre as cerca de 13000 espécies existentes de leguminosas, somente 20 são comumente consumidas pelo homem. Isoflavonas, fitoesteróis, inibidores de proteases, inositol hexafosfato e saponinas são os constituintes de leguminosas, com potencial farmacológico, de grande interesse ao homem. Nas sementes das leguminosas, existem os glicosídeos, convertidos pela bactéria intestinal em derivados com fraca atividade antioxidante e estrogênica. Os isoflavonóides estão presentes em concentrações plasmáticas suficientes para influenciar a atividade de enzimas intracelulares, síntese de proteínas, proliferação celular maligna, diferenciação e angiogênese. Altas concentrações plasmáticas de isoflavonóides foram encontrados em humanos vivendo em regiões com baixa incidência de câncer e doenças cardíacas (MAZUR et al., 1998).

Em Marrocos, 38 plantas são utilizadas no controle do diabetes. As principais são *Trigonella foenum graecum* L. (Leguminosae), *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) e *Artemisia herba-alba* Asso (Compositae) (ZIYYAT et al., 1997). A semente de *Trigonella foenum graecum* tem efeito hipoglicemiante em ratos (ALI et al., 1995) e em pessoas normais e diabéticas (SHARMA, 1986; SHARMA et al., 1990; CHADHA et al., 1998). Em ratos normais ou diabéticos o extrato dessa planta crua ou cozida, reduziu a glicemia (AJABNOOR & TILMISANY, 1988; ABDEL-BARRY et al., 1997). Inicialmente, esse efeito hipoglicemiante foi atribuído ao seu principal alcalóide, a trigonelina, um derivado do ácido nicotínico. Porém, esse foi excretado inalterado por gatos, cães e coelhos, após 1 mês de tratamento. O ácido nicotínico presente na semente é o componente hipoglicemiante mais ativo, porém seu efeito persiste durante pequeno período de tempo (MISHKINSKY et al., 1974). Foi reportado um

princípio ativo, isolado da semente, que aumenta a tolerância à glicose e reduz a glicemia em coelhos diabéticos, após administrado oralmente por 1 semana (AL-HABORI & RAMAN, 1998).

Foram propostos os seguintes mecanismos de ação de *T. foenum graecum*: aumento da utilização de glicose periférica; aumento de receptores de insulina nos eritrócitos (RAGHURAM et al., 1994); efeito estimulatório direto nas células β , devido ao composto 4-hidroxiisoleucina, presente na semente, o qual estimula a secreção de insulina (PETIT et al., 1995); redução da taxa de esvaziamento gástrico, com retenção de glicose no estômago e interferência direta em seu transporte e absorção (MADAR, 1984).

A semente de *T. foenum graecum* possui 48% de fibra alimentar solúvel (SHARMA, 1986). Segundo CHADHA et al. (1998) e BRAATEN et al. (1991), o efeito hipoglicemiante também pode ser atribuído à natureza da fibra e a sua viscosidade, responsável por retardar o esvaziamento gástrico, reduzindo o tempo de trânsito intestinal e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes, o que poderia permitir ao fígado estocar mais carboidrato absorvido (TOPPING et al., 1988). LAKSHMI & VIMALA et al. (1996) atribuem ao conteúdo de fibra, o efeito hipoglicemiante do sorgo, comparado a dietas a base de trigo ou arroz.

O desenvolvimento do diabetes é dificultado por alimentos mais lentamente digeridos e absorvidos em populações susceptíveis, como australianos nativos, que têm incidência de diabetes 10 vezes maior que os australianos caucasianos (THORBURN et al., 1987).

No entanto, segundo AJABNOOR & TILMISANY (1988), o efeito hipoglicemiante provavelmente não se deve à ação gastrointestinal da fibra, pois foi constatado em jejum. O aumento no conteúdo de fibra alimentar não alterou o metabolismo de glicose, insulina ou lipídios no plasma de pacientes com diabetes tipo 2 (HOLLENBECK et al., 1986).

Administração oral de extrato de *Artemisia pallens* diminui a glicemia em ratos diabéticos induzidos com aloxano e em ratos com hiperglicemia induzida por alimentação rica em glicose. O mecanismo proposto é a maior utilização de glicose periférica (SUBRAMONIAM et al., 1996).

Artemisia herba-alba Asso., comum no norte da África e em certas regiões da Ásia, é extensivamente utilizada na medicina popular no tratamento de helmintíases e diabetes. A erva produziu um efeito hiperglicemiante em camundongos e coelhos normais uma hora após a administração de $0,39 \text{ g.kg}^{-1}$ do extrato, entretanto, depois houve um declínio e a concentração de glicose foi menor que o controle, 8 horas após. Em coelhos com hiperglicemia induzida por aloxano, que receberam a erva, os níveis plasmáticos de glicose reduziram de $461,5 \pm 21,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ para $254,2 \pm 25,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ 6 horas após a administração da erva, permanecendo, porém, ainda maior que a glicemia dos coelhos controles ($127,3 \pm 4,1 \text{ mg.dL}^{-1}$) (média \pm erro-padrão) (MARRIF et al., 1995).

O extrato aquoso do fruto de *Citrullus colocynthis* L., quando administrado a coelhos normais e com diabetes induzido por aloxano, produziu efeito hipoglicemiante. Esse efeito foi devido principalmente a saponinas e também a componentes glicosídicos (ABDEL-HASSAN et al., 2000).

A administração oral de 10 g.kg^{-1} de extrato de *Lythrum salicaria* produziu efeitos hipoglicemiantes em ratos e camundongos hiperglicêmicos induzidos por glicose e epinefrina. O mecanismo proposto para o efeito do extrato na redução da resposta hiperglicemiante é o aumento do conteúdo de glicogênio (LAMELA et al., 1986).

Adição de 25 mg.kg^{-1} de folhas de *Bridelia ferruginea* reduziram em 40% a glicemia em coelhos normais. Essa redução foi similar ao efeito da glibenclamida. A redução máxima ocorreu em 2 horas (ONUNKWO et al., 1996).

O extrato de *Coriandrum sativum* possui ação antihiperglicemiante, pois promove a liberação da insulina e possui compostos que agem como tal, aumentando a captação e

metabolismo de glicose pelo músculo, o que implica na presença de mais de um constituinte ativo (GRAY & FLATT, 1999).

Segundo GONZÁLES et al. (1996), 1 mg.kg⁻¹ de extrato de *Opuntia fulliginosa* Mill. controla o diabetes em ratos diabéticos e em pacientes com diabetes tipo 2. Parece haver aumento da utilização de glicose em nível celular.

BABU & SRINIVASAN (1997) sugerem um possível efeito protetor do *Allium sativum* nas células β pancreáticas e, ou, efeito de sensibilização da insulina para explicar a melhora no 'status' metabólico de ratos diabéticos.

A forrageira *Solanum lycocarpum*, vulgarmente conhecida como fruta-de-lobo, é uma planta daninha com uso medicinal (BRANDÃO et al., 1985). Tem sido usada no controle do diabetes, entretanto apresentou efeito tóxico no sistema reprodutivo masculino, com possível atividade antiandrogênica, de camundongos tratados com 60 mg, 3 vezes por dia, durante 5 dias (SÁ et al., 2000). A extração do amido de seu fruto, segue as seguintes etapas: higienização, trituração, despulpamento, suspensão em água + amido, decantação por 24 horas em temperatura ambiente e secagem ao sol; resultando em frações escura e clara. Esta última tem sido utilizada por pessoas no controle do diabetes. Sua composição é 0,34% de proteínas, 0,08% de lipídios, 14,96% de umidade, 0,03% de cinzas e 94,31% de amido (MARCIANO, 1997).

Embora o nível de flavonóides não tenha sido determinado em *S. lycocarpum*, seu fruto contém 0,26% de solasodina (Kerber et al., 1996, citados por DALL'AGNOL & POSTER, 2000). *Solanum* spp. e *S. grayi* contém hibiscetina e o flavonóide onopordina (WOLLENWEBER & DIETZ, 1981). Os flavonóis são predominantes, porém as flavonas são mais amplamente encontradas na subclasse *Androceras* que em outras *Solanaceae* (WHALEN & MABRY, 1979). De 23 vegetais analisados, *S. tuberosum* (batata) foi o que apresentou menor conteúdo de fenóis, menor nível de flavonóides livres e totais e ainda assim, foi o segundo melhor em qualidade de antioxidantes, baseado nos fenóis totais. Os vegetais tiveram uma qualidade antioxidante comparável a dos flavonóides puros e foram superiores para as vitaminas antioxidantes (VINSON et al., 1998a). Dentre os polifenóis de *Solanum* spp., são encontrados antocianinas, coumarinas e derivados do ácido cinâmico. Além de quercetina e rutina, encontraram-se outros flavonóis glicosilados: kaempferol, miricetina e luteolina (HARBORNE, 1962).

2.2.4. Modelo de indução de diabetes em animais

Muito do conhecimento existente sobre o diabetes nunca teria sido adquirido sem o estudo de modelos animais, que podem ser divididos em 2 grupos: induzido (através de pancreatectomia, compostos químicos tais como aloxano e estreptozotocina, vírus e outros) e espontâneo (principalmente utilizando ratos e camundongos geneticamente modificados). Os cães provavelmente foram os primeiros animais a serem utilizados em estudos do metabolismo de glicose e desempenharam um papel primordial na investigação do desenvolvimento do diabetes e no uso da insulina no seu tratamento (ARRINGTON, 1972). No entanto, não existem evidências de que o diabetes espontâneo humano seja idêntico na patogênese ou nas complicações orgânicas, ao produzido em animais experimentais (BONDY, 1969).

A maneira mais comum de induzir diabetes e a mais utilizada em pesquisas é por meio de substâncias químicas, principalmente aloxano (5,6-dioxiuracil monohidratado) e estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureido)-D-glicopiranosose). Esses compostos causam danos às células β das ilhotas pancreáticas, alterando a produção de insulina e conseqüentemente, o metabolismo da glicose (HATCHELL et al., 1986). A estreptozotocina

causa aumento da glicogenólise, da lipólise e de triacilgliceróis devido ao aumento da atividade da lipase pancreática (HÄMÄLÄINEN & MÄKINEM, 1982). E ainda, segundo CACINI et al. (1993), destrói a maioria das células β do pâncreas que secreta insulina produzindo alterações complexas e interrelacionadas com a bioquímica de carboidratos, lipídios e proteínas, refletindo as observadas no diabetes tipo 1 de humanos.

Aloxano monoidratado, ácido dialúrico e aloxantina são capazes de induzir diabetes (ADAMS et al., 1984). Contudo, dose excessiva de aloxano pode causar a morte dos animais. Alguns animais apresentam resistência ao aloxano, ou seja, não desenvolvem hiperglicemia (Quadro 1). O aloxano pode produzir um estado de deficiência absoluta de insulina, característico do diabetes tipo 1 (DAVIS & GRANNER, 1996). A ausência completa de insulina plasmática não é encontrada em todos os pacientes diabéticos. A insulina é quase ausente no diabetes tipo 1 (BONDY, 1969) e em modelos de ratos (ALI et al., 1995). No diabetes tipo 2, a capacidade secretória de insulina é reduzida à metade do normal (BONDY, 1969).

O aloxano destrói as células β das ilhotas pancreáticas (GORRAY et al., 1983; BORG, 1981), agindo especificamente em sua membrana plasmática (KIM et al., 1994). Acredita-se que esse dano seja iniciado por radicais livres de oxigênio (SLONIM et al., 1983; JANJIC et al., 1999), formados por ciclo redox entre aloxano e tiol, o qual pode ser crucial para a ação tóxica do aloxano (LENZEN & MUNDAY, 1991). Também ocorre inibição da atividade da adenilato ciclase, gerando radicais livres de oxigênio reativos (PARK et al., 1995). O aloxano pode causar acúmulo de H_2O_2 (KIM et al., 1994) suficiente para induzir fragmentação de DNA em ilhotas pancreáticas isoladas (TAKASU et al., 1991). Tanto o aloxano quanto o H_2O_2 elevam o Ca^{++} livre citossólico aumentando o influxo de Ca^{++} e um mecanismo dependente de Ca^{++} contribui para iniciar a fragmentação do DNA e causar citotoxicidade às células β pancreáticas. Isto sugere que a inibição da secreção de insulina seja devido a efeitos estruturais que funcionais. O verapamil, um antagonista do Ca^{++} , protegeu as células β pancreáticas do efeito citotóxico de H_2O_2 e do aloxano (KIM et al., 1994). Contrariamente, alguns estudos reportam que a inibição da secreção de insulina, induzida por aloxano, seja por meio de efeito funcional rápido, como a inativação direta da glucoquinase (KIM et al., 1994; PARK et al., 1995) ou proteína quinase dependente de Ca^{++} e calmodulina (COLCA et al., 1983). Algumas enzimas dependentes de Ca^{++} , incluindo endonucleases estão associadas com fragmentação de DNA e citotoxicidade (VANDERBILT et al., 1982).

A glicose pode anular o efeito do aloxano, protegendo as células β das ilhotas (BORG et al., 1985; GORRAY et al., 1983) ou de H_2O_2 embora não afete sua produção (PARK et al., 1995). Glicose e aloxano agem no mesmo sítio, ou em sítios adjacentes, na membrana plasmática das células β (DIXIT & KAUNG, 1985). BORG et al. (1979) demonstraram que, *in vitro*, o aloxano teve um efeito inibitório no metabolismo de glicose, e que essa ação foi prevenida pela exposição prévia a altas concentrações de glicose.

O diabetes também pode ser induzido pela dieta. A galactosemia foi induzida e mantida alimentando-se ratos com uma dieta contendo 40% de D-galactose. Elevações crônicas nas concentrações de hexose sangüíneas podem ser mantidas em presença de níveis normais de insulina no sangue (CACINI et al., 1993). Em camundongos, a hiperglicemia foi induzida, produzindo efeito glicogenolítico no fígado e músculo, por glicose e epinefrina, (LAMELA et al., 1986), que estimula os receptores α do sistema nervoso autônomo (MOSSBERG & TAEGTMEYER, 1991). A hiperglicemia induzida por frutose ocorre devido a uma resistência à insulina, ou seja, enfraquecimento na capacidade da insulina suprimir a saída de glicose hepática e aumentar a captação de glicose muscular, refletindo em alterações no metabolismo de gordura e aumento nos ácidos graxos livres, triacilgliceróis e outros lipídios (IKEDA & FUJIYAMA, 1998).

Quadro 1 – Mortalidade, resistência à hiperglicemia e glicemia de alguns animais cobaia em função da dose de aloxano aplicada

Animal	Dose de aloxano (mg.kg ⁻¹)	Mortalidade (%)	Resistência (%)	Glicemia (mg.dL ⁻¹)	Fonte
Coelho	100	30 (7) ³	20	> 250	MINNICH & ZILVERSMIT (1989)
	100	16,7 (7)	33,4	> 250	HADOUR et al. (1998)
Cachorro	90 a 100	9,5 (2)	42,9	378 ± 21	McDOWELL et al. (1994)
	50 a 75 ¹	47	9	> 250	PEMBERTOM (1970)
Gato	50	0 (3)	100	75 a 79	
	100	0 (3)	100	40 a 125	
	150	100 (3)	100	59 a 120	HATCHEL et al. (1986)
Camundongo	20 ²	16,7 (15)	----	> 270	BERTUGLIA et al. (1995)
Ratos	40		19 ⁴	> 250	MELLO & LUCIANO (1995)
	60	50 (4)	----	527 ± 40	KIM et al. (1994)
	60	0	75	> 120	MARCIANO (1997)
	60	7,5 (4)	59	128 a 386	FRINHANI (1998)

¹ Os animais que se apresentavam normoglicêmicos 3 dias após a aplicação de aloxano, receberam uma segunda aplicação com uma dose maior.

² Aplicado durante 2 dias

³ Dias após a aplicação do aloxano em que ocorreu a morte dos animais, citado entre parênteses.

⁴ Percentagem de ratos mortos e resistentes em conjunto.

2.3. Flavonóides

Flavonóides constituem um grupo de compostos polifenólicos de origem vegetal, de baixo peso molecular, cuja estrutura básica pode ser hidrogenada, hidroxilada, metilada, sulfatada, glicosilada, etc. Sua atividade bioquímica e de seus metabólitos, assim como sua classificação, depende da estrutura química (COOK & SAMMAN, 1996). Os flavonóides consistem de uma estrutura de 3 anéis (A, C e B) com um esqueleto difenil propano (Figura 2). O anel A é biossintetizado por condensação de malonil-coenzima A (CoA) derivado do metabolismo da glicose. Os anéis B e C são também derivados do metabolismo da glicose pela via do ácido chiquimato (FORMICA & REGELSON, 1995). Os flavonóides foram subdivididos em 8 classes, com base no esqueleto carbônico das flavanonas (Quadro 2). Podem ocorrer como glicosídeo (mais abundantes na natureza) ou aglicona, ou seja, conjugado ou não à molécula de açúcar, respectivamente.

Ocorrem em frutas, vegetais, nozes, grãos, flores e casca de árvores. Existem cerca de 4000 tipos de flavonóides identificados em espécies vegetais, exercendo funções tais como a proteção contra patógenos e injúria celular oxidativa e estimulação da polinização por insetos. As antocianinas são flavonóides responsáveis pelas cores de diversos órgãos vegetais.

Muitos flavonóides ocorrem naturalmente como derivados glicosilados. Como exemplo dos mais comuns utilizados na dieta podemos citar: quercitrina, rutina e robinina que são hidrolisados pela flora bacteriana produzindo açúcar livre e flavonóides biologicamente ativos. A quercetina é o flavonóide mais encontrado nos alimentos (HERTOG et al., 1995).

As principais fontes de flavonóides na alimentação são chá, cebola, maçã, vinho tinto e frutos cítricos (HERTOG et al., 1995; BRONNER & BEECHER, 1995). Na cebola, a

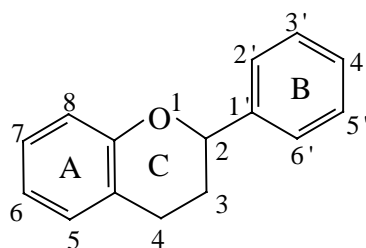


Figura 2- Estrutura básica dos flavonóides.

Quadro 2 - Classificação, exemplos e ocorrência dos flavonóides ¹

Classes	Exemplos	Ocorrência
Flavanonas	Naringina e Naringenina	Frutas cítricas
Flavonas	Diosmetina, luteolina	Cereais, frutas e ervas
Flavonóis	Quercetina, kaempferol	Vegetais e frutas
Isoflavonóis	Daidzeína, genisteína	Leguminosas
Antocianinas	Delfinidina	Frutas e flores
Flavans: mono, bi e triflavanos,	Catequinas, epicatequinas e teaflavina	Frutas e chás
Dihidroflavonóis	6-C-dihidroquercetina	Casca de árvore
Chalconas	Triangularina e aurentiacina	Folhas de <i>Myrica gale</i>

¹ Fonte: PETERSON & DWYER (1998).

concentração de flavonóis é maior nas escamas exteriores (HIROTA et al., 1998). As etapas de descascamento e limpeza de cebola provocam uma perda de 39% de quercetina e 64% de kaempferol. Os processamentos de cozimento aquecimento de cebola, feijões verdes e ervilhas pouco afetam o conteúdo de flavonóides (EWALD et al., 1999). Após longos períodos de estocagem, a perda de quercetina em cebola, é mínima (PRICE & RHODES, 1997).

As classes flavonas, flavonóis, antocianinas e flavanonas ocorrem em plantas cítricas (BRONNER & BEECHER, 1995) e em uvas (GIRARD & MAZZA, 1998). Nas uvas roxas, os principais compostos fenólicos presente são as antocianinas (GIRARD & MAZZA, 1998), seguidas de narirutina e naringina (BRONNER & BEECHER, 1995). O suco de uva contém de 62 a 68 e 200 mg.100g⁻¹, de narirutina e naringina, respectivamente. As flavanonas têm como principal fonte as plantas cítricas, sendo hesperidina e narirutina os principais flavonóides do suco de laranja, que contém 120 a 150 e 24 a 30 mg.100 g⁻¹, respectivamente (BRONNER & BEECHER, 1995). Esses valores indicam que os frutos cítricos podem ser a principal fonte de flavonóides na dieta. Foi estimado que o consumo médio diário de naringenina (aglicona tanto da narirutina quanto da naringina) e de hesperidina, pela população norte-americana, é de 2,7 a 3,1 e 15 a 18 mg, respectivamente (BRONNER & BEECHER, 1995). A naringina, que possui sabor intenso, é formada pela naringenina, uma aglicona, ligada a 2 açúcares, ramnose e glicose (ESAKI et al., 1994). O teor de naringenina, uma aglicona, equivale a cerca de 47% tanto do teor de narirutina quanto do de naringina, 2 flavonóides glicosilados (BRONNER & BEECHER, 1995).

Narirutina e naringenina podem ser encontradas também em cominho e hortelã-pimenta (PETERSON & DWYER, 1998). Naringenina está presente nas flores de *Barleria*

chrstata, nas folhas de *Centaurea arguta*, em *Helichrysum viscosum*, nas sementes e folhas de *Helichrysum arenarium* e na madeira de *Nothofagus* spp., *Ferreira spectabilis*, *Intsia bijuga*, *Soymida febrifuga*, *Prunus* spp. e *Larix dahrica* (WOLLENWEBER & DIETZ, 1981).

2.3.1. Absorção de flavonóides

A taxa de absorção e penetração de flavonóides na pele é muito pequena (HAVSTEEN, 1983). Os flavonóides glicosilados são solúveis em água, e as agliconas são lipofílicas (WOLLENWEBER & DIETZ, 1981). Polifenóis solúveis em lipídios são provavelmente absorvidos via circulação linfática, como os lipídios da dieta (MANACH et al., 1996).

Solubilização é um pré-requisito para uma efetiva absorção no intestino delgado, a qual é limitada pela taxa de hidrólise. A microflora do intestino grosso, especialmente *Bacteroides* spp. possuem glicosidases capazes de hidrolisar flavonóides glicosilados, com alto grau de especificidade, liberando flavonóides agliconas (BOKKENHEUSER et al., 1987). A isoflavona glicosilada daidizina, administrada a ratos via oral, foi metabolizada e produziu sua aglicona daidzeína (YASUDA & OHSAWA, 1998). Flavonóides glicosilados, ingeridos por ratos livres de microorganismos, apareceram nas fezes sem serem hidrolisados (GRIFFITHS & BARROW, 1972).

O alto peso molecular dos flavonóis presentes nos alimentos, como os glicosilados, prejudicam sua absorção no intestino delgado. Suas ligações β -glicosídicas são resistentes à degradação por hidrolases intestinais. O flavonóide glicosilado passa inalterado pelo intestino grosso (FORMICA & REGELSON, 1995). A clivagem das ligações β -glicosídicas não ocorre antes do composto alcançar a microflora do intestino grosso (CHOUDHURY et al., 1999). No entanto, quercetina glicosilada é absorvida diretamente através do intestino delgado, via transportador glicose/ Na^+ (GEE et al., 1998). A ingestão de 0,1g de quercetina teve uma absorção de 52% de quercetina glicosilada, de 24% de quercetina aglicona e 17% do rutinoisil quercetina (EWALD et al., 1999).

Não se sabe se naringina e hesperidina, flavonóides glicosilados das plantas cítricas, são absorvidos intactos como glicosídeos ou se as ligações glicosídicas são clivadas antes ou após a absorção, gerando as agliconas naringenina e hesperetina. Ligações glicosídicas são menos estáveis que a maioria das ligações glicurônicas e podem não resistir ao pH ácido do estômago. A glicosidase das bactérias intestinais podem clivar açúcares residuais. Esses 2 flavonóides são absorvidos do trato gastrointestinal humano, após ingestão de composto puro, suco ou frutos cítricos são detectados na urina, 6 horas após a primeira dose e por 24 horas após a última. Quando administrou-se 500 mg de naringina, 4,84% de naringenina foi detectado na urina, 3 horas após e por 38 horas (AMEER et al., 1996).

A maioria dos flavonóides absorvidos no intestino são transportados para o fígado, pela veia porta. Devido a baixa polaridade de muitas agliconas, especialmente das fortemente metiladas, elas são transportadas provavelmente ligadas à albumina do soro. A maior parte dos flavonóides é liberada no fígado (HAVSTEEN, 1983), onde podem sofrer modificações adicionais como: metilações, hidroxilações ou redução do grupo carbonila no heterociclo de flavanonas (MANACH et al., 1996). O fígado também sintetiza conjugados com moléculas de sulfato ou ácido glicurônico (MANACH et al., 1996). A detecção de naringenina na urina do rato foi de 10 e 20%, quando administrada via oral e intravenosa, respectivamente. Quando administrada via oral, a maioria da naringenina aparece na urina conjugada a ácido glicurônico. Em contraste, quando administrada via intravenosa, a maior parte na naringenina aparece na forma de glicosídeo nativo, sugerindo que a glicuronidação, assim como a hidrólise podem ocorrer no epitélio intestinal. A glicuronidação influenciará as propriedades de redução e

atividade antioxidante dos metabólitos (CHOUDHURY et al., 1999). Nenhum resíduo é acumulado no organismo (HAVSTEEN, 1983).

Em ratos, flavonóides ou seus derivados têm sido detectados no sangue, tanto 6 horas (derivado glucuronido de diosmetina) quanto 15 a 30 minutos (luteolina) após a administração (SHIMOI et al., 1998; RHODES, 1996). Dez minutos após a administração de 20 mg.kg⁻¹ de naringenina via intravenosa, em ratos, observou-se concentração total de 4,84 µg.mL⁻¹ no plasma e 2,11 µg.g⁻¹ no córtex cerebral (PENG et al., 1998).

Estudos evidenciam que flavonóides são absorvidos em humanos. Essa absorção ocorre a taxas variáveis. Por exemplo, 10 a 20% de isoflavonóides (XU et al., 1994) e 1% de quercetina (COOK & SAMMAN, 1996). Após 48h da ingestão de 215 g de cebola, contendo 64,2 mg de quercetina, esse foi detectado no plasma. Ingestão de 500g de brócolis contendo 64,2 mg de kaempferol, por 12 dias, permitiu a detecção de 52 a 57 ng. mL⁻¹ na urina (VINSON et al., 1998a). Das (1971), citado por COOK & SAMMAN (1996), detectou catecolaminas no plasma de humanos, 6 horas após a administração de 92,3 mg.kg⁻¹ de peso e por 96 horas. Os compostos fenólicos foram excretados na urina tanto na forma livre como na forma conjugada. Quase toda fração de cada um dos 7 flavonóides de uma mistura de ervas medicinais foi encontrada na urina, conjugada com ácido glicurônico (LI et al., 1998). Nas fezes, 19% da dose administrada foi excretada inalterada. Não houve efeitos colaterais (COOK & SAMMAN, 1996).

2.3.2. Efeitos farmacológicos

Provavelmente mais devido ao potencial eletroquímico que a outros mecanismos, flavonóides inibem várias enzimas, pertencentes a todas as classes: hidrolases (β -glucuronidase, β -galactosidase, lipases e fosfodiesterases), liases (DOPA descarboxilase), transferases (catecol O-metiltransferase), hidroxilases (arilhidroxilase), oxirredutases (aldose redutase) e quinase (hexoquinases) (HAVSTEEN, 1983). Os flavonóides exercem efeitos como antioxidante, quelantes de cátions divalentes e carreamento de radicais livres. Com isso, os flavonóides têm apresentado efeitos biológicos tais como: antibacteriano, antiviral, antiinflamatório, antialérgico, com ações vasodilatadoras, inibição da peroxidação lipídica, da agregação plaquetária e da permeabilidade capilar (HERTOG et al., 1995). Formas concentradas de flavonóides, como própolis, têm sido usadas popularmente em casos de inflamações, alergia, dor de cabeça, infecções, dentre outras.

2.3.2.1. Ação hipoglicemiante

A secreção de insulina é regulada por diferentes mecanismos, sendo que o mais importante depende da concentração intracelular de Ca⁺⁺. O cálcio é utilizado como sinalizador intracelular, ativando uma série de reações que irão culminar com a secreção da insulina pelas células β do pâncreas (ALBERTS et al., 1997). O metabolismo da glicose, iniciado pela glicoquinase, resulta em modificação na proporção ATP/ADP, que causa inibição dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP e despolarização da célula. Isto resulta na ativação compensatória de canais de Ca⁺⁺ dependente da voltagem, e conseqüentemente, aumento do influxo de Ca⁺⁺ para dentro da célula β , o qual ativa a fosfolipase A e a fosfolipase C, que provocam formação de ácido araquidônico, inositol-polifosfatos e diacilglicerol. Este mobiliza Ca⁺⁺ a partir do retículo endoplasmático, elevando ainda mais a concentração citossólica desse cátion, que atua como o secretagogo da insulina (DAVIS & GRANNER, 1996).

O Ca⁺⁺ é bombeado ativamente para fora da célula, pela Ca⁺⁺ATPase presente na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (ALBERTS et al., 1997). Os flavonóides

quercetina e, em menor extensão, o floretina, inibiram a atividade Ca^{++} -ATPase da membrana cerebral, sinaptosomal (GROSMAN, 1998).

O acúmulo de cálcio no citossol promove a ativação de uma proteína quinase, dependente de cálcio, chamada proteína quinase C, que parece estar diretamente envolvida nos processos de secreção de insulina. Esta proteína quinase C ativaria uma cascata de fosforilações, que induziria à ativação de proteínas reguladoras, que aumentariam a transcrição de genes que codificam a insulina (MARZZOCO & TORRES, 1999; ALBERTS et al., 1997). Flavonóis e flavonas, e, em menor extensão, flavanonas e isoflavonas parecem ser os mais potentes inibidores de proteína quinase C e de fosfoinositol-3-quinase (AGULLO et al., 1997; GAMET-PAYRASTRE et al., 1999). Os principais requerimentos estruturais para uma potente inibição são a presença de uma dupla ligação no anel C e a ausência de substituição da hidroxila. A substituição do grupo metoxila pelo grupo hidroxila reduz o efeito inibitório, sugerindo a importância da ponte de hidrogênio entre o flavonóide e a quinase (GAMET-PAYRASTRE et al., 1999).

Outra hipótese de regulação da secreção da insulina seria a ativação da proteína quinase A por meio do acúmulo de cAMP, no citossol. Esta enzima, por sua vez, ativaria uma cascata de fosforilações, culminando com a transcrição de genes específicos para a insulina (ALBERTS et al., 1997).

Outro mecanismo de regulação da secreção de insulina envolvendo tirosinas quinase também foi observado. Genisteína, um inibidor de tirosina quinase aumentou a liberação de insulina (SORENSEN et al., 1994). DRAKE & POSNER (1998) sugerem que as proteínas tirosinas fosfatases, mais que as proteínas tirosinas quinases, desempenham um papel crítico na regulação da ação da insulina. A genisteína tem mostrado ação ativadora daquelas proteínas, estimulando a secreção de insulina.

Em camundongos, a genisteína provocou um aumento, reversível e dependente da concentração, na liberação de insulina pelas células β do pâncreas, apesar da redução das concentrações de cálcio nessas células. Esse aumento foi cessado pela adrenalina ou omissão do cálcio extracelular e não foi acompanhado por qualquer aumento nas concentrações de cAMP, inositol fosfato ou adenina nucleotídeo. A daidzeína, um análogo da genisteína, não afetou as tirosinas quinases e foi sensivelmente menos potente nos canais de Ca^{++} e K^+ , mas aumentou a secreção de insulina de maneira similar (JONAS et al., 1995).

Quercetina, presente na cebola, estimulou a liberação de insulina e aumentou a captação de Ca^{++} de células de ilhotas isoladas (Hif & Howell, 1985, citados por FORMICA & REGELSON, 1995). Houve redução da glicemia em ratos diabéticos alimentados com cebola durante 8 semanas. Pimentão não mostrou nenhuma influência no estado hiperglicêmico dos animais diabéticos (BABU & SRINIVASAN, 1997). GEE (1998) sugere uma interação entre o flavonóide quercetina com receptores transportadores de glicose presentes na membrana de enterócitos do intestino delgado. Os flavonóides: fisetina, mirecitina, quercitina, apigenina, cianidina, daidzeína, hesperetina, naringenina e catequina inibiram em 50% a captação de glicose em mielócitos e leucócitos *in vitro*, entretanto, *in vivo* esta inibição ainda não pode ser constatada, uma vez que nem mesmo a concentração fisiológica dos flavonóides individuais no intestino humano foi estabelecida (PARK, 1999).

Extrato de folhas de *Bridelia ferruginea*, contendo rutina reduziu a glicemia de coelhos normais em 40% (ONUNKWO, 1996).

2.3.2.2. Na enzima aldose redutase

A formação de catarata em animais diabéticos ocorre devido à presença de excesso de sorbitol no cristalino (lente) dos olhos. Alterações na atividade da enzima aldose redutase, devido ao diabetes (BELL et al., 2000), ou devido à alimentação contendo 30% de galactose (SATO et al., 1998) podem levar à formação de catarata. Em condições normais de glicemia, a aldose redutase, que converte glicose em sorbitol, compete com hexoquinase no metabolismo de glicose. Pouco sorbitol é produzido porque a hexoquinase tem mais afinidade pela glicose que a aldose redutase. A hexoquinase está presente no cristalino em baixas concentrações. Em diabéticos, devido à disponibilidade de glicose excessiva, há saturação da hexoquinase, e aumento da atividade da aldose redutase, acarretando maior produção de sorbitol (ZENON et al., 1990), que se acumula no cristalino, tornando-o opaco, pela retenção de água no tecido (KINOSHITA et al., 1962). Em ratos, o rápido desenvolvimento de catarata, de 3 a 4 meses, parece estar relacionado com a alta atividade da aldose redutase (VARMA et al., 1977).

Flavonóides inibem a aldose redutase e promovem redução na concentração de sorbitol e frutose na lente. Quercitrina é um potente inibidor não competitivo da aldose redutase (VARMA et al., 1975; VARMA et al., 1977; VARMA et al., 1980; OLIVEIRA et al., 1997). Hesperetina e ácido clorogênico foram mais efetivos na inibição da aldose redutase, porém mais suscetíveis à oxidação e menos estáveis que flavonas (VARMA, 1986).

Flavonas são mais ativas na inibição da aldose redutase no cristalino de ratos que flavonóis e flavanonas. Glicosídeos se mostraram mais ativos que agliconas e o número de açúcares presentes nos flavonóides afeta sua atividade (SHIMIZU et al., 1984). O flavonóide capillarina, extraído de *Artemisia capillari*, inibiu a aldose redutase no cristalino de bovinos (OKADA et al., 1995).

Ratos diabéticos se alimentando de 70 mg.kg⁻¹ de diosmina por dia, durante 8 meses, não apresentaram alteração na atividade da aldose redutase (VERTOMMEN et al., 1994).

2.3.2.3. Como antioxidantes

Metais, como ferro e cobre, podem contribuir para estresse oxidativo catalisando a oxidação da glicose, ascorbato e ácidos graxos poliinsaturados e promovendo a fixação de espécies reativas como peróxido de hidrogênio e peróxido de ácidos graxos (HÁ & LEAN, 1998).

Antioxidantes são compostos que inibem ou reduzem a oxidação de outras moléculas. Constituem 2 categorias: sintéticos e naturais. Os antioxidantes naturais são compostos fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), compostos nitrogenados (alcalóides, aminoácidos e aminas), carotenóides e ácido ascórbico. Em geral, antioxidantes sintéticos possuem estruturas fenólicas com vários graus de substituição alquila (VELIOGLU et al., 1998).

Antioxidantes naturais previnem a deteriorização em alimentos e inibem perigosas oxidações causadas por peroxidação de lipídios (NAKAGAWA et al., 1997). O corpo tem um sistema de defesa antioxidante baseado em compostos endógenos como ácido úrico, β -caroteno, vitaminas E e C e enzimas tais como glutatona peroxidase e superóxido dismutase (HÁ & LEAN, 1998). As enzimas glutatona peroxidase, glutatona redutase e glutatona transferase desempenham a função de proteger as células contra injúria oxidativa causada por radicais livres e outras espécies oxidantes (GALVEZ et al., 1995). Essas enzimas atuam juntas durante a decomposição de peróxido de hidrogênio ou outros hidroxiperóxidos orgânicos (MEISTER, 1988).

A conversão de glicose a sorbitol consome NADPH. A hiperglicemia eleva a velocidade dessa reação e, conseqüentemente, o consumo de NADPH, que é requerido para a formação de glutatona pela glutatona redutase. A redução na concentração de glutatona pode comprometer a proteção contra radicais livres de oxigênio (CAMERON & COTTER, 1995). Os flavonóides de plantas cítricas, eriocitrina e hesperidina aumentaram a concentração e atividade antioxidante dessas enzimas no rim e no fígado de ratos diabéticos (MIYAKE et al., 1998).

Flavonóides, como quercetina e kaempferol, são polifenóis antioxidantes, facilmente oxidados e podem interferir com oxiredutores, mas são também fortes carreadores de radical livre. Todavia, são capazes de formar radicais livres se ligando a metais pesados (HAVSTEEN, 1983). Na oxidação *in vitro* de LDL, muitos fenóis, entre eles os flavonóides, foram mais poderosos antioxidantes que vitaminas C, E e β -caroteno (VINSON et al., 1998a). As propriedades antioxidantes dos flavonóides são devido ao carregamento de ânions superóxidos, enquanto que outros antioxidantes se ligam aos radicais livres carregando os radicais hidroxila (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988). Os flavonóides do chá, catequinas e flavonóis, também têm função antioxidante (BALENTINE et al., 1997).

2.3.2.4. Na peroxidação de lipídios

Ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares, são oxidados por enzimas e por reações incontroláveis de radicais livres. As reações de peroxidação de lipídios, geram mais radicais livres, que mantém a cadeia de reações, cujos produtos finais são inertes. Isto pode resultar em patologias como aterosclerose e câncer.

LDLs modificadas por oxidação celular ou por cobre sofreram endocitose e degradação por macrófagos em uma proporção maior que LDL nativos (COOK & SAMMAN, 1996). LDL oxidadas também provocam dano ao endotélio, facilitando o processo aterogênico, permitindo a entrada de elementos sangüíneos e aderência de plaquetas (KWITEROVICH, 1997). O nível de LDL oxidado no plasma está associado com a severidade da aterosclerose em humanos (HERTOG et al., 1995).

Metais de transição, como ferro e cobre, podem contribuir para o estresse oxidativo por catalisar a oxidação da glicose, ascorbato e ácidos graxos poliinsaturados, facilitando a fixação de espécies reativas como peróxido de hidrogênio e peróxido de lipídio. Altos níveis de cobre promovem peroxidação de lipídios (HÁ & LEAN, 1998).

O aumento da resistência de LDL à oxidação depende de sua interação com íons Cu^{++} . As substituições hidroxila, na posição orto, 3' e 4' no anel B, na estrutura do flavonóide, são importantes para a formação de quelato com Cu^{++} . A presença do grupo 3-hidroxila no flavonóide aumenta a oxidação de quercetina na presença de íons Cu^{++} (BROWN et al., 1998).

Flavonóides podem proteger o LDL de modificação oxidativa se eles forem liberados para o espaço subendotelial, onde ocorre essa oxidação (COOK & SAMMAN, 1996). Flavonóides podem inibir a peroxidação de lipídios não enzimática por meio de diferentes mecanismos, por exemplo: a) carregamento de radicais livres, b) quelação de metais divalentes (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988), embora esse mecanismo não tenha função principal na atividade antioxidante (SASKIA et al., 1998) e c) inibição da auto-oxidação de glicose, que ocorre na hiperglicemia, uma importante etapa da glicosilação, que produz espécies reativas de oxigênio (WOLFF & DEAN, 1987).

Hamsters hipercolesterolêmicos que receberam extrato de citrus + ácido ascórbico apresentaram menor taxa de peroxidação de lipídios quando comparados com hamsters hipercolesterolêmicos controle (VINSON et al., 1998b).

Os flavonóides inibem a peroxidação de lipídios *in vitro*, no estágio inicial, agindo como carreador dos ânions superóxidos e radicais hidroxilas. Podem também regenerar o α -tocoferol do LDL, doando-lhe 1 átomo de hidrogênio. Em adição à propriedade antioxidativa, alguns flavonóides agem como agente quelante de metal e inibem o avanço da superoxidação da reação fenton, que é importante fonte de radicais ativos de oxigênio (COOK & SAMMAN, 1996).

A hidroxilação do núcleo flavona parece aumentar a atividade anti-peroxidativa dos flavonóides (GALVEZ et al., 1995), o que pode explicar o fato das flavonas aglicona polihidroxiladas como a quercitina, morina, hipolentina, fisetina, gossipetina e galangina serem potentes inibidores da oxidação de LDL (COOK & SAMMAN, 1996). MIYAKE & SHIBAMOTO (1997), testando alguns compostos naturais de plantas como lacinilene A, naringina, galangina e rutina, verificaram que a atividade antioxidativa está associada ao número de grupos hidroxilas nas posições 3' e 4' do anel B do núcleo flavona. A flavanona naringenina, não tem substituição no anel C, portanto tem pequeno efeito antioxidante na peroxidação de lipídios (COOK & SAMMAN, 1996), assim como os outros principais flavonóides cítricos: hesperetina e naringina (PETERSON & DWYER, 1998).

Quando a peroxidação de lipídios é induzida por via não enzimática, como sistema Fe^{++} -ácido ascórbico, os flavonóides epicatequina e luteolina são mais potentes na inibição da peroxidação de lipídios, seguidos de quercetina e catequina, delphinidina, kaempferol, apigenina e naringenina (GALVEZ et al., 1995).

McANLIS et al. (1998) demonstraram que os antioxidantes presentes no chá, os quais possuem ação *in vitro*, se absorvidos em grandes quantidades, são capazes de proteger a LDL da oxidação *in vivo*.

2.3.2.5. Em doenças cardiovasculares

Flavonóides podem inibir doenças do sistema vascular resultantes da oxidação de lipídios e produção de eicosanóides. Apesar do foco de atenção nessa capacidade de ação dos flavonóides, esses podem inibir o desenvolvimento de doenças vasculares em humanos, interferindo na replicação bacteriana, produtos finais de glicosilação induzidas por carboidratos, efeitos estrogênicos, enzimas proteolíticas, replicação viral, entre outros (SCHRAMM & GERMAN, 1998).

A interação física de leucócitos com células endoteliais, induzida por processos inflamatórios, é importante no surgimento de doença vascular. *In vivo*, os flavonóides podem inibir essa adesão e também a ativação de leucócitos através da sua capacidade de alterar a produção de fatores inflamatórios derivados de células, como as citocinas, que promovem uma rápida e forte adesão aos leucócitos (SCHRAMM & GERMAN, 1998).

A frequência e a severidade de infecções bacterianas são correlacionadas com a ocorrência e a severidade de doenças vasculares. O crescimento de algumas bactérias simbióticas, em plantas, pode ser estimulado pelos flavonóides naringenina e daidzeína (WEBSTER, 1998; GOUGH et al., 1997). Em humanos, ao contrário, alguns flavonóides parecem inibir bactérias patogênicas ao sistema vascular (SCHRAMM & GERMAN, 1998).

A peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) está positivamente associada com aterogêneses. Compostos fenólicos (incluindo flavonóides) obtidos de vinho tinto inibiram a oxidação catalítica de LDL *in vitro* (COOK & SAMMAN, 1996). Isto pode explicar, parcialmente, o "paradoxo francês", que é o baixo índice de doenças coronarianas na população da França, que consome vinho regularmente, comparado a outras populações, apesar do alto consumo de gorduras. O vinho aumenta a liberação de prostaciclina e óxido

nítrico pelas células endoteliais, os quais promovem redução da vasoconstrição, agregação plaquetária e trombose (SCHRAMM et al., 1997).

HERTOG et al. (1995) conduziram um estudo por 25 anos, a partir de 1960, em 16 regiões de 7 países, registrando as diferenças entre as populações quanto às taxas de mortalidade devido às doenças crônicas coronárias e ao câncer. A quantidade de flavonóides antioxidantes ingeridos foi inversamente proporcional à mortalidade por doença coronária, mas não foi observada associação na mortalidade por câncer.

2.3.2.6. Na agregação plaquetária

A obstrução plaquetária é característica de lesões aterosclerótica, em estágios avançados. As plaquetas podem obstruir a veia resultando em isquemia (SCHRAMM & GERMAN, 1998). Alguns flavonóides inibem a agregação e adesão plaquetária, reduzindo o risco de trombose (COOK & SAMMAN, 1996).

Os flavonóides podem inibir o metabolismo de ácido araquidônico e a função plaquetária, mais pela interação com enzimas que pelo efeito antioxidante. Ainda com relação aos efeitos antitrombóticos, os flavonóides antagonizam a formação e função do receptor tromboxano (COOK & SAMMAN, 1996).

Para que o flavonóide iniba a ação plaquetária em humanos, deve haver uma dupla ligação entre o C-2 e o C-3, um grupo hidroxila C-3 e um grupo carbonila no C-4. O efeito inibitório dos flavonóides na função plaquetária está dimensionado por glicosilação no C-3, saturação da dupla ligação entre o C-2 e C-3, e poliidroxilação (COOK & SAMMAN, 1996). Desta maneira, os flavonóides glicosídeos e flavanonas derivados parecem não afetar a função plaquetária.

2.3.2.7. Na vasodilatação e na atividade antiinflamatória

Os leucotrienos são mediadores de processos alérgicos agudos, como a reação anafilática e a asma, dentre outros. Os leucotrienos são formados, pela ação de lipoxigenases, a partir do ácido araquidônico, que é um constituinte de fosfolípidios da membrana celular, sendo liberado por hidrólise catalisada por fosfolipases. Há evidências que a atividade antiinflamatória, produzida nos animais, por alguns flavonóides, dentre eles a quercetina, é resultado da inibição da enzima lipoxigenase pro-inflamatória e da produção de metabólitos do ácido araquidônico. A naringenina tem a capacidade de regular a produção de leucotrienos (JENKINS & ATWAL, 1995; ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988).

Os flavonóides apigenina, kaempferol, naringenina e rutina inibem a lipoxigenase (PETERSON & DWYER, 1998). Delfinidina foi o mais potente flavonóide, seguido de epicatequina, catequina, kaempferol, naringenina e apigenina, na inibição da peroxidação de lípidios, induzida via ácido araquidônico (GALVEZ et al., 1995).

Flavonóides parecem aumentar a vasodilatação, induzindo o relaxamento das células musculares lisas (COOK & SAMMAN, 1996). Naringenina, luteolina e eriodictiol, extraídos de *Satureja obovata* L., provocaram vasodilatação em artérias isoladas de ratos quando foi induzida contração por K^+ ou noradrenalina (SÁNCHEZ DE ROJAS et al., 1996).

Em altas concentrações de ânions superóxido, um flavonóide sintético, atenuou a inibição do relaxamento induzida por acetilcolina, nas artérias da orelha e do cérebro. A propriedade de carreamento desse flavonóide reduziu a concentração de ânions superóxido, permitindo que mais fator de relaxamento do endotélio alcançasse e penetrasse o interior de células musculares lisas. O óxido nítrico, uma molécula sinalizadora, é sintetizada por células

endoteliais e liberada por nervos autônomos da parede vascular por indução indireta da acetilcolina (ALBERTS et al., 1997). O flavonóide sintético pode proteger o óxido nítrico, do ataque oxidativo, especialmente em altos níveis de ânion superóxido, podendo ter valor terapêutico promovendo vasodilatação natural (GIRARD et al., 1995).

2.3.2.8. Na glicosilação

Flavonóides como quercetina, rutina e kaempferol têm efeito preventivo na glicosilação de proteínas como hemoglobina e insulina (ASGARY et al., 1998, ASGARY et al.1999).

Hesperetina e naringenina aceleram a formação de frutossaminas, mas reduzem o acúmulo de produtos finais de glicosilação. Esses favonóides talvez possam inibir alguma etapa na via de glicosilação, após o rearranjo de Amadori (uma das etapas da reação de Maillard). Porém, seus glicosídeos hesperidina e naringina aceleram a formação de frutossaminas e produtos finais de glicosilação (MORIMITSU et al., 1995).

Administração oral diária de 70 mg.kg⁻¹ de diosmina, durante 8 meses, a ratos diabéticos reduziu a glicosilação de proteínas e inibiu a peroxidação de lipídios, pois o malonaldeído, um produto final estável da peroxidação de lipídios, foi reduzido (VERTOMMEN et al., 1994).

CAPÍTULO 1

INDUÇÃO DE DIABETES MELLITUS EM COELHOS E EFEITOS DO FLAVONÓIDE NARINGENINA E FRUTA-DE-LOBO NA HIPERGLICEMIA

1. INTRODUÇÃO

O diabetes ainda é uma doença incurável. Em pacientes, o objetivo do tratamento é manter a saúde e a qualidade de vida, procurando controlar a glicemia em níveis normais, evitando hipo e hiperglicemia, que podem causar crises agudas ou complicações secundárias.

A terapia do diabetes tipo 2 é feita por meio de atividade física e dieta adequada, para a maioria dos casos. Alguns pacientes necessitam também de medicamentos hipoglicemiantes orais e mesmo aplicação de insulina exógena (HÁ & LEAN, 1998). Porém, tais medicamentos, mesmo induzindo boa resposta inicial, perdem a eficiência com o decorrer do tempo de uso, em 25% dos pacientes. Além disso, causam efeitos adversos em 3% dos pacientes, sendo a hipoglicemia um dos mais importantes efeitos colaterais das sulfoniluréias (SUNDARAM et al., 1996). Pacientes com diabetes tipo 1 obrigatoriamente necessitam receber insulina exógena. Isso, juntamente com dieta adequada e atividade física, permite sobrevida praticamente normal. Porém, alguns pacientes diabéticos desenvolvem resistência à insulina, necessitando de aplicações de doses crescentes.

A fitoterapia é popularmente utilizada por pacientes diabéticos, sendo considerada eficaz e de baixo custo. Segundo DALL'AGNOL & POSER (2000), fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* A.F.C.P. Saint-Hilaire) tem sido utilizada objetivando a redução da hiperglicemia, da obesidade e do nível de colesterol. Os estudos de casos, realizados por MARCIANO (1997) em alguns pacientes diabéticos, apresentam evidências que a fruta-de-lobo pode diminuir a hiperglicemia.

Já foi constatado que alguns flavonóides podem induzir aumento na liberação da insulina e reduzir a hiperglicemia (BABU & SRINIVASAN, 1997; JONAS et al., 1995; JEAN & BODINIER, 1994; SORENSON et al., 1994; ONUNKWUO et al., 1996). Naringenina, na forma de narirutina, é um dos principais flavonóides do suco de laranja, que contém cerca de 12 a 15 mg.100 g⁻¹ (BRONNER & BEECHER, 1995). Sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de citros (FAO, 2000), essa poderia ser a principal fonte de flavonóides na dieta.

Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito do amido de fruta-de-lobo e do flavonóide naringenina nos níveis de glicose e de outros constituintes sanguíneos em coelhos com diabetes induzido por meio da aplicação de aloxano. Como ainda não está bem estabelecida a dose ideal de aloxano a ser administrada aos coelhos, de modo que haja mínima mortalidade e um número máximo de coelhos se torne diabético, foi conduzido estudo prévio para determinar essa dose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biofármacos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Utilizaram-se coelhos adultos, machos, da raça Albino Nova Zelândia. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, em temperatura ambiente e receberam água e 125 g.dia^{-1} de ração para reprodução e crescimento Coelhil R[®], Socil guyomarc' H Ind. e Com. Ltda.

Após jejum de 24 horas, todos os coelhos foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (20 mg.kg^{-1}) e cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (5 mg.kg^{-1}). A anestesia é necessária devido à injeção de aloxano ser muito dolorida.

Cerca de 30 min. após a aplicação da anestesia, suspensão de aloxano (5%) (Alloxan Sigma[®]), em NaCl 0,9% foi injetada na veia marginal da orelha dos coelhos, utilizando-se seringas descartáveis de 5 ml, com agulhas hipodérmicas. O volume máximo de aloxano injetado nos coelhos foi de 2 mL. Na testemunha (normal) injetou-se somente NaCl 0,9%. Em todos os coelhos, injetou-se 10 mL de glicose Sigma[®] p.a. 50% (p/v), via intraperitoneal, 4, 8 e 12 horas após a administração do aloxano, para evitar hipoglicemia.

Para as determinações de glicose, triacilgliceróis, colesterol, creatinina e albumina, coletaram-se 5 mL de sangue, através da incisão do plexo capilar abaixo do olho, a qual foi feita com a extremidade cortante de um tubo capilar utilizado normalmente para determinação de hematócrito. O sangue foi centrifugado a $7100 \times g$, por 15 min., e o soro sobrenadante foi analisado no analisador multiparamétrico automático Alizé[®]. A glicemia foi determinada pelo método enzimático de glicose oxidase utilizando-se o kit Biolab[®]. Esse método se baseia na formação de um cromógeno vermelho-cereja, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose. A determinação colorimétrica do colesterol total baseia-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácidos graxos, mediado pela colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela colesterol oxidase em colesten-4-ona-3, liberando água oxigenada que juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, são transformados no cromógeno que absorve em 500 nm. A determinação dos triacilgliceróis séricos foi enzimática. A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido, reage com ATP, em presença da glicerolquinase, formando glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetonafosfato, pelo glicerol-3-fosfato oxidase, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com paraclorofenol e amino 4 antipirina, em presença da peroxidase, transforma-se no cromógeno que absorve em 505 nm.

Foram considerados diabéticos os coelhos que apresentaram glicemia (nível de glicose sangüínea) igual ou superior a 180 mg.dL^{-1} , acompanhada de sintomas característicos de diabetes como poliúria, polidipsia, menor ganho, ou mesmo perda de peso. Cada coelho constituiu uma unidade experimental.

2.1. Efeito da dose de aloxano na indução de diabetes em coelhos

Visando determinar a dose ideal de aloxano para indução de diabetes em coelhos, utilizaram-se 45 coelhos, com peso variando entre 1,1 a 1,8 kg. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais sem controle de temperatura que variou de 20 a 40°C. Os tratamentos constituíram-se de 5 doses de aloxano (90, 105, 120, 135 e 150 mg.kg⁻¹) e a testemunha (normal), com 6 a 8 repetições. Aos 4 dias após a aplicação do aloxano, determinaram-se os níveis sanguíneos de glicose, colesterol e triacilgliceróis. Os coelhos foram pesados 1 dia antes e 6 dias após a aplicação do aloxano.

2.2. - Efeito do flavonóide naringenina e fruta-de-lobo na glicemia de coelhos diabéticos.

2.2.1. Experimento 1

Ao final do experimento anterior, 5 dias após a aplicação do aloxano, foram selecionados os 8 coelhos testemunhas normais e 21 diabéticos, que passaram a receber os tratamentos deste experimento. Dentre os coelhos diabéticos, 8 morreram dentro de 3 dias. Deste modo, 5 coelhos constituíram a testemunha diabética, 3 passaram a receber diariamente uma cápsula de 20 mg de naringenina e 5, uma cápsula de 40 mg de farinha de fruta-de-lobo.

Os níveis sanguíneos de triacilgliceróis, colesterol e glicose foram determinados após 6, 13, 20 e 27 dias e o peso após 1, 8, 15, 20 e 27 dias do início da administração dos tratamentos.

2.2.2. Experimento 2

Baseado nos resultados do primeiro experimento, foi utilizada a dose de 100 mg.kg⁻¹ de aloxano para indução do diabetes em coelhos. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais sem controle de temperatura que variou de 20 a 40°C. Administrou-se aloxano, em 42 coelhos. Outros 7 constituíram a testemunha normal. Oito dias após a injeção de aloxano, foram determinados os constituintes sanguíneos: triacilgliceróis, colesterol, creatinina, albumina e glicose. Dentre os coelhos que receberam aloxano, 2 morreram na primeira semana e 30 apresentaram glicemia menor que 180 mg.dL⁻¹, sendo então descartados. Os outros 10 foram divididos em 2 tratamentos: a testemunha diabética e os que receberam uma cápsula diária de 20 mg de naringenina, cuja administração teve início no dia seguinte. A determinação da concentração sanguínea de creatinina consiste em medir o composto formado durante 1 minuto da reação entre a creatinina e o ácido pícrico, que absorve em 492 nm. A albumina sérica foi quantificada colorimetricamente com verde de bromo cresol, tampão succinato e mertiolate de sódio e analisados no comprimento de onda de 628 nm.

Aos 8, 15, 22 e 29 dias após o início da administração da naringenina, os níveis sanguíneos de triacilgliceróis, colesterol, creatinina, albumina e glicose, assim como o peso foram novamente determinados.

2.3. Análises estatísticas

Todos os delineamentos foram inteiramente casualizados.

Para comparar o efeito de doses de aloxano sobre os níveis sanguíneos de glicose, colesterol e triacilgliceróis nos coelhos, 4 dias após a aplicação do aloxano, realizou-se a

análise de regressão, onde a é o valor inicial estimado no tempo 0 e b é a taxa de variação (inclinação da reta).

A análise de regressão também permitiu comparar a variação entre os tratamentos sobre todas as características avaliadas.

Baseado nas formas das curvas das médias das variáveis determinadas ao longo do tempo, estimaram-se 3 modelos de regressão para cada tratamento em função do tempo: modelo linear simples ($Y = a + b \times \text{tempo}$), linear hiperbólico ($Y = a + b / \text{tempo}$) e um modelo não linear: exponencial negativo ($Y = a.e^{(b \times \text{tempo})}$). A análise de regressão foi feita com os dados do delineamento experimental (regressão considerando as repetições). Fez-se comparação dos coeficientes de regressão ($\hat{\beta}$) entre 2 tratamentos, pelo intervalo de confiança da diferença entre os coeficientes

As análises de correlação objetivaram constatar se alguns dos constituintes era altamente correlacionado e de forma consistente. Pois, em outros estudos, seriam analisados apenas um deles.

A análise de covariância (ANCOVA) dos constituintes sangüíneos e do peso ao final do experimento, considerando como covariável a respectiva variável determinada no início do experimento objetiva reduzir o erro experimental. Entretanto, para algumas características, não foi possível realizar análise de covariância devido a não homogeneidade dos coeficientes de regressão (de todos os tratamentos) da variável em relação à covariável.

Todas análises estatísticas foram processadas com o programa "Statistica for Windows 5.5" (STATSOFT, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito da dose de aloxano na indução de diabetes em coelhos

A testemunha, que não recebeu aloxano, apresentou níveis de glicose, colesterol, triacilgliceróis e ganho de peso de $127,09 \pm 6,84 \text{ mg.dL}^{-1}$; $128,19 \pm 31,69 \text{ mg.dL}^{-1}$; $225,91 \pm 58,72 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $3,57 \pm 4,12\%$ (média \pm I.C. $(\mu)_{0,95}$), respectivamente.

A Figura 3 evidencia que não houve relação linear entre doses de aloxano e níveis sangüíneos de glicose, triacilgliceróis e colesterol, o que também foi verificado pela análise de variância da regressão, que não rejeitou a hipótese dos coeficientes de regressão linear serem nulos.

Os níveis de glicose, colesterol e triacilgliceróis foram positiva e altamente correlacionados entre si e negativamente, porém pouco correlacionados com o ganho de peso dos coelhos (Figura 4).

Até 4 dias após a aplicação do aloxano, morreram de 29 a 50% dos coelhos que receberam doses de aloxano $\geq 120 \text{ mg.kg}^{-1}$. Dentre os coelhos que receberam 90 e 105 mg.kg^{-1} , 71 e 83%, respectivamente, apresentaram-se diabéticos (glicemia $> 180 \text{ mg.dL}^{-1}$). No entanto, 7 dias após, haviam morrido 50 a 71% dos coelhos que receberam doses $\geq 120 \text{ mg.kg}^{-1}$, assim como 29 e 17% dos que receberam doses de 90 e 105 mg.kg^{-1} , respectivamente (Quadro 3). Não houve morte adicional nas 3 semanas seguintes.

Os 13 coelhos diabéticos sobreviventes apresentaram glicemia de 315,8 a 642,6 mg.dL^{-1} . Os 8 coelhos mortos, entre 4 e 7 dias, apresentavam glicemia de 505 a 927 mg.dL^{-1} .

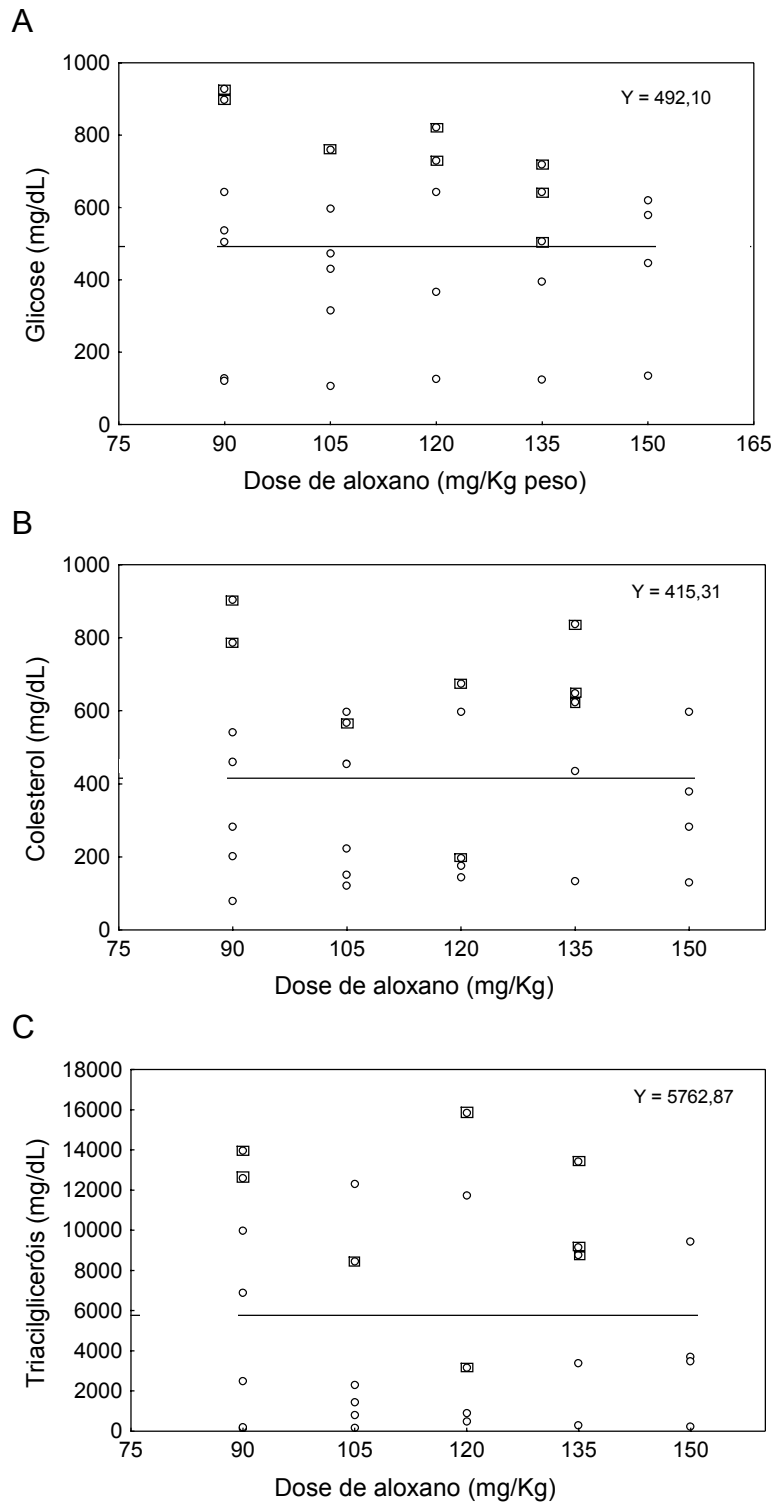


Figura 3 – Efeito de doses de aloxano nos níveis sanguíneos de glicose (A), colesterol (B) e triacilgliceróis (C) em coelhos, 4 dias após a aplicação de aloxano (◻ coelhos que morreram até 3 dias após esta data de avaliação).

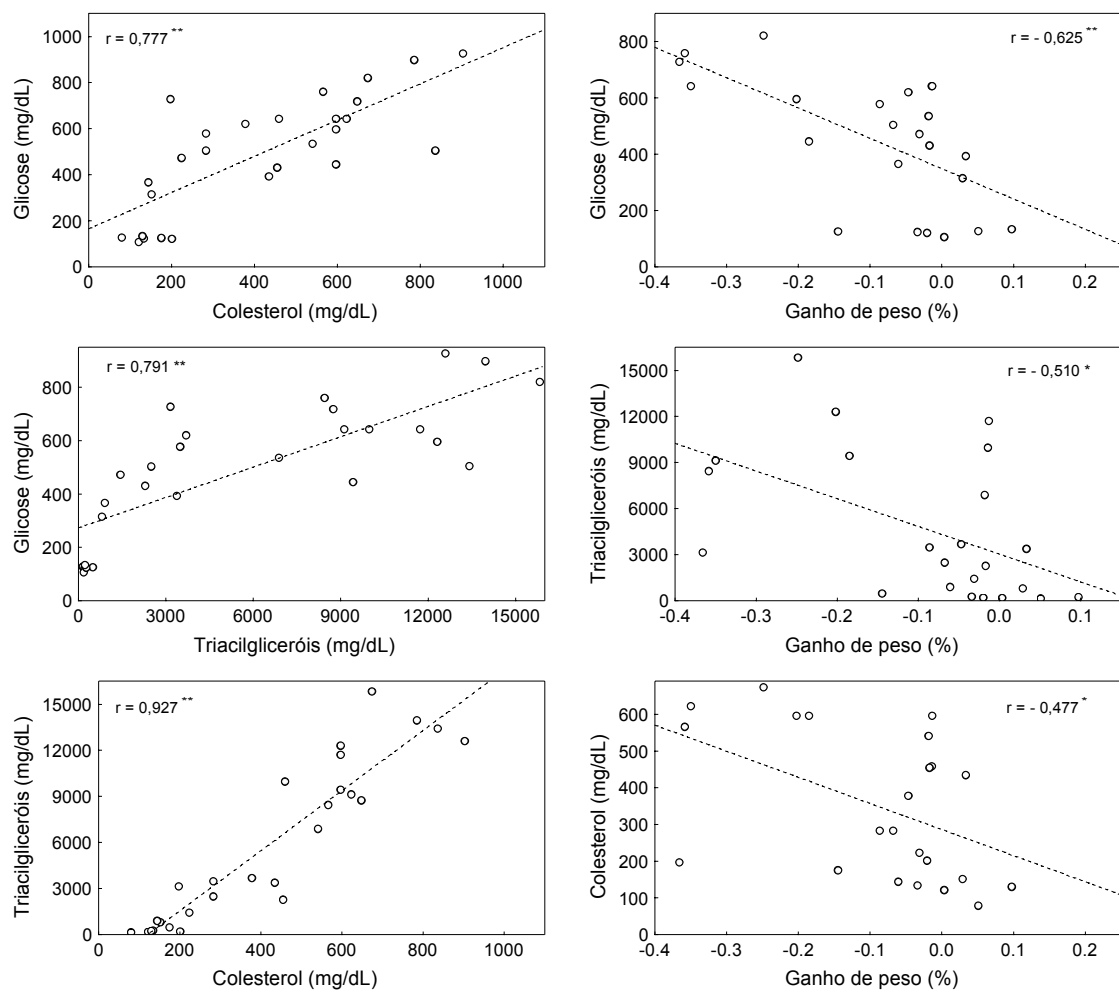


Figura 4 – Correlações lineares simples entre constituintes sanguíneos e ganho de peso em coelhos, na primeira semana após aplicação do aloxano (*, ** significativo: $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente).

Quadro 3 - Efeito de doses de aloxano no número de coelhos diabéticos¹ e mortos

Dose de aloxano (mg.kg ⁻¹)	Número de coelhos	Coelhos mortos			Diabéticos	
		Até 4 dias ^{2,3}	Entre 4 e 7 dias ^{2,4}	Total	Aos 4 dias ²	Sobreviventes ⁴
Testemunha	8	0	0	0	0/8 ⁵ (0%)	0/8 ⁶ (0%)
90	7	0	2	2	5/7 (71,3%)	3/7 (42,9%)
105	6	0	1	1	5/6 (83,3%)	4/6 (66,7%)
120	8	3	2	5	4/5 (80,0%)	2/8 (25,0%)
135	7	2	3	5	4/5 (80,0%)	1/7 (14,3%)
150	8	4	0	4	3/4 (75,0%)	3/8 (37,5%)

¹ Glicemia > 180 mg.dL⁻¹.

² Dias após aplicação do aloxano.

³ Antes da determinação da glicemia.

⁴ Entre 7 e 30 dias não houve morte de animais.

⁵ Coelhos diabéticos / coelhos vivos aos 4 dias após a aplicação de aloxano.

⁶ Coelhos diabéticos sobreviventes / coelhos que receberam aloxano.

3.2. - Efeito do flavonóide naringenina e fruta-de-lobo na glicemia de coelhos diabéticos.

Experimento 1

Em coelhos diabéticos, as médias dos níveis dos constituintes sangüíneos e do peso indicam pequena diferença entre os tratamentos (Figura 5). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos aplicados a esses coelhos (Quadro 4). Os intervalos de confiança das médias dos tratamentos em cada época de avaliação são apresentados no Quadro 5, evidenciando que os coelhos diabéticos, que compunham um mesmo tratamento, apresentavam alta variabilidade com relação às características avaliadas.

No entanto, dentro de alguns tratamentos, houve variações significativas nos valores finais em relação aos iniciais de algumas dessas características. Os coelhos ganharam peso durante o experimento, exceto os que receberam farinha de fruta-de-lobo. Somente as testemunhas normal e diabética diminuíram o nível de colesterol. Na testemunha normal, o nível de triacilgliceróis diminuiu e a glicemia aumentou (Quadro 5).

Baseado nas formas das curvas das médias das variáveis determinadas ao longo do tempo (Figura 5), estimaram-se 3 modelos de regressão para cada tratamento em função do tempo. Nenhum desses modelos explicou satisfatoriamente a variação da glicemia em função do tempo. Com relação à variável peso, o modelo linear simples ajustou-se bem para os tratamentos, à exceção do tratamento fruta-de-lobo. O modelo hiperbólico foi adequado para os tratamentos em relação ao nível de triacilgliceróis e, à exceção do tratamento fruta-de-lobo, também para o nível de colesterol (Quadro 6).

A comparação dos coeficientes de regressão ($\hat{\beta}$) entre 2 tratamentos, pelo intervalo de confiança da diferença entre os coeficientes mostrou que não houve diferenças significativas na variação em função do tempo entre o tratamento naringenina e a testemunha diabética para as variáveis peso e níveis de colesterol e triacilgliceróis, nem entre o tratamento fruta-de-lobo e a testemunha diabética para a variável nível de triacilgliceróis (Quadro 6).

As correlações entre peso e constituintes sangüíneos são apresentadas no Quadro 7.

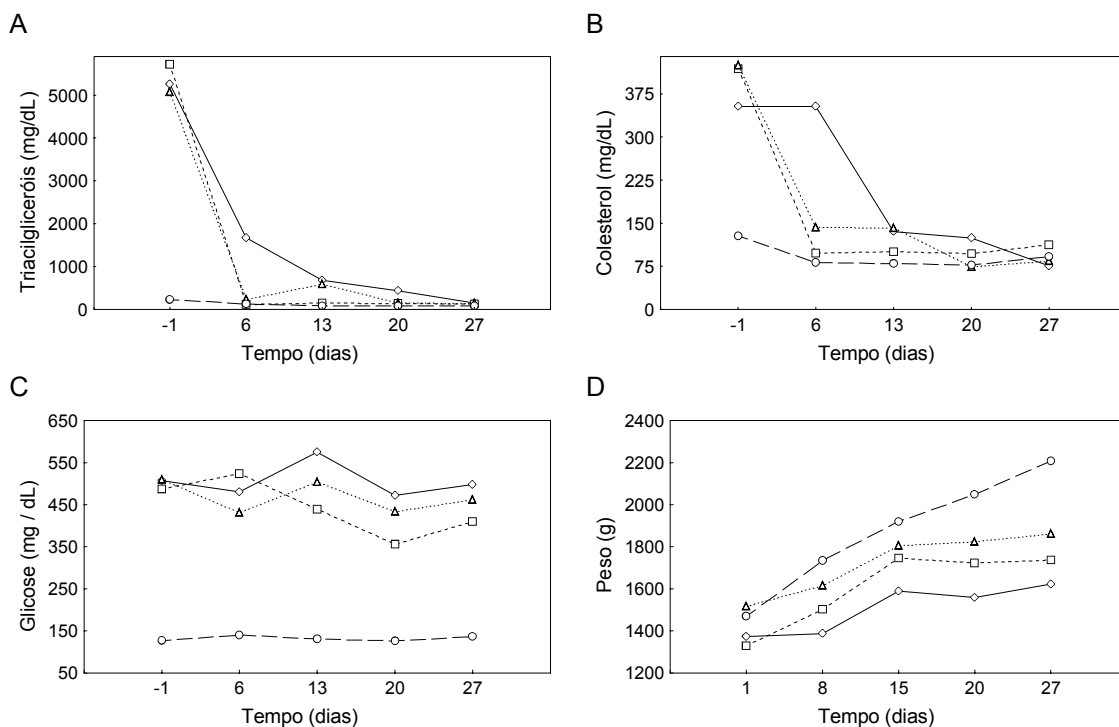


Figura 5 - Média dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis (A), colesterol (B), glicemia (C) e peso (D) em coelhos, no experimento 1. O dia zero corresponde ao início da administração dos tratamentos (◇ - fruta-de-lobo; □ - naringenina; Δ - testemunha diabética e O – testemunha normal).

Quadro 4 – Resumo das análises de covariâncias¹ do peso e constituintes sanguíneos dos coelhos diabéticos em função dos tratamentos, ao final² do experimento 1

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Regressão ³	1	793252,84	19,546	0,002
	Tratamentos ⁴	2	35118,68	0,865	0,453
	Resíduo	9	40584,87		
	C.V. (%)			11,57	
Colesterol	Regressão	1	31,74	0,032	0,863
	Tratamentos ⁴	2	984,81	0,990	0,418
	Resíduo	7	994,52		
	C.V. (%)			35,27	
Triacilgliceróis	Regressão	1	6980,96	1,056	0,338
	Tratamentos ⁴	2	1873,45	0,283	0,762
	Resíduo	7	6611,69		
	C.V. (%)			59,51	
Glicose	Regressão	1	223269,92	11,389	0,010
	Tratamentos ⁴	2	11943,24	0,609	0,567
	Resíduo	9	19603,70		
	C.V. (%)			30,41	

¹ Foi considerada como covariável, a respectiva variável determinada no início do experimento: o peso 1 dia após e os constituintes sanguíneos 1 dia antes do início da aplicação dos flavonóides

² Determinadas 27 dias após o início da aplicação dos flavonóides

³ Correspondente à covariável

⁴ Fruta-de-lobo, naringenina e testemunha diabética.

Quadro 5 – Peso (g) e níveis dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina ou farinha de fruta-de-lobo (experimento 1)

Constituintes sanguíneos	Dias ¹	Testemunha normal ²	Testemunha diabética	Diabéticos + naringenina	Diabéticos + fruta-de-lobo
Peso	1	1470,0 ± 186 ³ a ⁴	1516,0 ± 102,3 a	1328,3 ± 633,9 a	1374,0 ± 246,0 a
	27	2206,9 ± 170,0 b	1861,0 ± 314,0 b	1736,7 ± 879,5 b	1623,0 ± 501,3 a
Colesterol	-1	128,2 ± 31,7 a	424,4 ± 215,7 a	418,3 ± 464,9 a	353,1 ± 218,6 a
	27	91,4 ± 22,7 b	83,9 ± 22,2 b	112,3 ± 124,8 a	75,7 ± 45,6 a
Triacilgliceróis	-1	225,9 ± 58,7 a	5075,6 ± 5389,5 a	5711,3 ± 1441 a	5256,3 ± 5170 a
	27	82,3 ± 33,6 b	133,5 ± 84,3 a	125,9 ± 75,0 a	152,6 ± 319,0 b
Glicose	-1	127,1 ± 6,8 a	508,9 ± 169,3 a	487,7 ± 253,9 a	507,4 ± 134,6 a
	27	137,0 ± 5,3 b	461,2 ± 311,0 a	409,4 ± 541,0 a	497,6 ± 170,0 a
Nº de coelhos		8	5	3	5

¹ Dias após início aplicação dos tratamentos.

² Coelhos que não receberam aloxano.

³ Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

⁴ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada variável, pelo teste t (P < 0,05).

Quadro 6 – Parâmetros estimados e coeficiente de determinação (r²) do modelo linear simples e hiperbólico de peso (g) e constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) em função do tempo (dias) em coelhos de 4 tratamentos e comparação dos coeficientes de regressão entre tratamentos e testemunha diabética (experimento 1)

Variável (Y)	Tratamento	Parâmetros ¹	r ² (%) ²	s ($\hat{\beta}$) ³	n ⁴	s [d] ⁵	I.C.($\beta_1 - \beta_2$) _{0,95}
Peso	Fruta-de-lobo	$\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}$ tempo					
	Naringenina	1355,98 + 10,59 ^{n.s.}	83,86	6,82			
	T. diabética	1373,05 + 16,500 *	80,68	6,58	10	7,41	1,86 ± 15,27
	T. normal	1523,62 + 14,140**	91,03	3,40	20		
Colesterol		$\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}/\text{tempo}$					
	Naringenina	1478,00 + 28,019**	98,88	3,39			
	T. diabética	126,29 – 289,82 **	99,18	51,38	10	72,75	4,49 ± 149,88
	T. normal	132,72 - 285,33 **	91,38	51,51	19		
	T. normal	86,08 – 42,00 **	94,02	8,82			
Triacilglicerol	Fruta-de-lobo	1563,96 – 3620,21*	88,07	1242,73	15		778,89 ±
	T. diabética	635,39 – 4399,10 **	98,05	893,24	19	1530,45	3060,89
	Naringenina	567,95 – 5096,95 *	98,98	1423,29	9		
	T. diabética	635,39 – 4399,10 **	98,05	893,24	19	1680,37	697 ± 3461,56
	T. normal	104,07 – 117,611 **	85,86	16,99			

^{n.s.}, *, ** Não-significativo e significativo (P < 0,05 e P < 0,01), respectivamente.

¹ Obtidos com todos os dados de cada unidade experimental.

² Soma de quadrado (sq) da regressão / sq tratamentos.

³ Desvio-padrão do coeficiente de regressão.

⁴ Número de graus de liberdade do resíduo puro da regressão.

⁵ Desvio-padrão da diferença entre os coeficientes: s [d] = (s² ($\hat{\beta}_1$) + s² ($\hat{\beta}_2$))^{1/2}.

Quadro 7 - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso e constituintes sangüíneos de coelhos ao final do experimento ²

	Peso	Colesterol	Triacilgliceróis	Glicose
Peso	----	0,35	-0,44	-0,27
Colesterol	0,70	----	-0,20	-0,43
Triacilgliceróis	-0,88*	-0,42	----	0,77 *
Glicose	-0,85	-0,25	0,82	----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 8 coelhos testemunhas normais e a diagonal inferior, em 5 coelhos testemunhas diabéticos.

² 32 dias após a aplicação do aloxano.

Experimento 2

Em coelhos diabéticos, as médias dos níveis dos constituintes sangüíneos e do peso, no decorrer do experimento, indicam pequena diferença entre os tratamentos quanto aos níveis de glicose, albumina, creatinina e ao peso, e maiores diferenças com relação aos níveis de colesterol e triacilgliceróis (Figura 6). No entanto, pelo teste t, ao final do experimento, não houve diferenças significativas entre os tratamentos aplicados a esses coelhos, em relação a quaisquer das variáveis determinadas (Quadro 8). Entretanto, dentro de alguns tratamentos, houve variação significativa nos valores iniciais e finais de algumas destas características. Somente os coelhos testemunha normal ganharam peso e apresentaram aumento nos níveis de creatinina durante o experimento. Somente as testemunhas diabéticas que receberam naringenina diminuíram o nível de colesterol. A glicemia diminuiu nas testemunhas diabéticas e o nível de albumina diminuiu nas testemunhas diabéticas e nos coelhos que receberam naringenina. Os coelhos diabéticos, que compunham um mesmo tratamento, apresentaram alta variabilidade com relação às características avaliadas, evidenciada pelo intervalo de confiança de suas médias (Quadro 8).

Baseado nas formas das curvas de variações das médias das variáveis determinadas ao longo do tempo (Figura 6), estimaram-se 3 modelos de regressão para cada tratamento em função do tempo: modelo linear simples, linear hiperbólico e um modelo não linear: exponencial negativo. Quando, para o mesmo modelo, ambos os tratamentos aplicados aos coelhos diabéticos apresentaram alto r^2 (coeficiente de determinação), foi feita análise de variância da regressão, utilizando os dados do delineamento experimental (regressão considerando as repetições) e comparação dos coeficientes de regressão ($\hat{\beta}$). Essa análise revelou não haver relação entre o tempo e o nível de colesterol nos coelhos tratados com naringenina. Os demais modelos selecionados, mostraram-se adequados. A comparação dos coeficientes de regressão entre 2 tratamentos, pelo intervalo de confiança da diferença entre os coeficientes mostrou que não houve diferenças na variação em função do tempo entre o tratamento naringenina e a testemunha diabética para as variáveis níveis de colesterol e de albumina (Quadro 9). As correlações entre peso e constituintes sangüíneos são apresentadas nos Quadros 10 e 11.

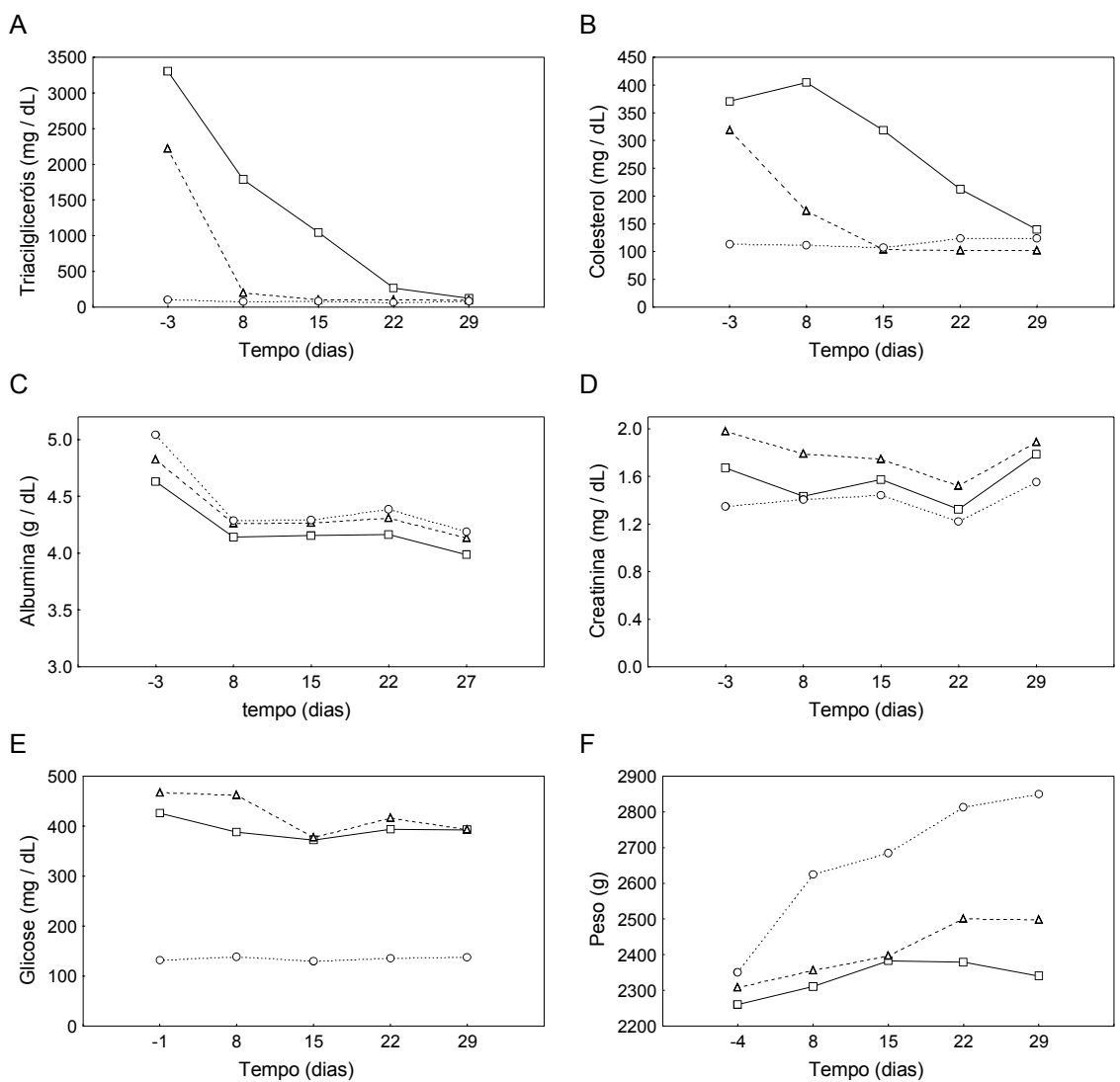


Figura 6 - Médias dos níveis sanguíneos ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) de triacilgliceróis (A), colesterol (B), albumina ($\text{g}\cdot\text{dL}^{-1}$) (C), creatinina (D), glicemia (E) e peso (g) (F), em coelhos, no experimento 2. O dia zero corresponde ao início da administração dos tratamentos (□ - naringenina; Δ - testemunha diabética e ○ - testemunha normal).

Quadro 8 – Peso (g) e concentração dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina (experimento 2)

	Dias ¹	Testemunha normal ²	Testemunha diabética	Diabéticos + Naringenina
Peso	-4	2350,7 ± 254,2 ³ a ⁴	2308,0 ± 376,7 a A ⁵	2260,0 ± 191,7 a A
	29	2850,0 ± 270,5 b	2498,0 ± 328,0 a A	2340,0 ± 597,0 a A
Colesterol	-3	113,2 ± 36,9 a	318,4 ± 228,5 a A	370,6 ± 286,1 a A
	29	123,4 ± 45,0 a	102,0 ± 25,9 a A	139,8 ± 76,3 b A
Glicose	-1	131,4 ± 7,8 a	467,1 ± 156,1 a A	425,9 ± 169,1 a A
	29	137,7 ± 9,1 a	392,6 ± 206,2 b A	392,5 ± 274,8 a A
Triacilgliceróis	-3	99,6 ± 22,7 a	2219,1 ± 3108,3 a A	3300,4 ± 3793,4 a A
	29	82,1 ± 26,9 a	98,2 ± 27,4 a A	125,7 ± 70,6 a A
Creatinina	-3	1,3 ± 0,1 a	2,0 ± 0,7 a A	1,7 ± 0,3 a A
	29	1,6 ± 0,2 b	1,9 ± 0,5 a A	1,8 ± 0,1 a A
Albumina (g.dL ⁻¹)	-3	5,0 ± 0,4 a	4,8 ± ,4 a A	4,6 ± ,6 a A
	29	4,2 ± 0,1 a	4,1 ± 0,2 b A	4,0 ± 0,2 b A
N ^o de coelhos		7	5	5

¹ Dias após o início da administração do flavonóide.

² Coelhos que não receberam aloxano.

³ Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

^{4, 5} Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, e pela mesma letra maiúscula, na linha, indicam que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, e entre tratamentos, respectivamente, pelo teste t (P < 0,05).

Quadro 9 – Comparação dos coeficientes de regressão entre os tratamentos naringenina e testemunha diabética (T. diabética) no experimento 2

Variável (Y)	Tratamento	Parâmetros ¹	r ² (%) ²	F	s ($\hat{\beta}$) ³	n ⁴	s [d] ⁵	I.C.($\beta_1 - \beta_2$) _{0,95}
$\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta} \cdot \text{tempo}$								
Colesterol	Naringenina	402,41 – 7,98	79,75	2,78 ^{n.s}				
	T. diabética	255,78 – 6,77	80,03	16,76**				
Triacilglicerol	Naringenina	2760,81 - 102,58	95,83	9,27**	31,73	20	38,14	42,33 ± 79,71
	T. diabética	1399,91 – 60,25	63,54	8,84**	21,16	20		
$\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta} / \text{tempo}$								
Albumina	Naringenina	4,46 – 0,017	76,28	15,06**	0,31	20	0,39	0,001 ± 0,821
	T. diabética	4,62 – 0,018	70,72	35,42 *	0,24	20		

¹ Obtidos com todos os dados de cada unidade experimental.

² Soma de quadrado (sq) da regressão / sq tratamentos.

³ Desvio-padrão do coeficiente de regressão.

⁴ Número de graus de liberdade do resíduo puro da regressão.

⁵ Desvio-padrão da diferença entre os coeficientes: s [d] = (s² ($\hat{\beta}_1$) + s² ($\hat{\beta}_2$))^{1/2}.

Quadro 10 - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso e constituintes sanguíneos no início do experimento 2 ²

	Peso	Colesterol	Glicose	Triacilgliceróis	Creatinina	Albumina
Peso	----	0,23	0,33	-0,52	0,25	-0,78
Colesterol	-0,65 *	----	-0,75*	0,62	0,77 *	0,18
Glicose ³	0,19	0,49	----	-0,81 *	-0,56	-0,67
Triacilgliceróis	-0,67 *	0,98 **	0,49	----	0,38	0,81 *
Creatinina	0,00	-0,10	0,03	-0,10	----	-0,13
Albumina	0,22	-0,75 *	-0,41	-0,69 *	0,01	----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 7 coelhos testemunhas normais e a diagonal inferior, em 10 coelhos diabéticos.

² Oito dias após a aplicação do aloxano.

³ Baseada nos valores de 10 dias após a aplicação do aloxano.

Quadro 11 - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso e constituintes sanguíneos ao final do experimento 2 ²

	Peso	Colesterol	Glicose	Triacilgliceróis	Creatinina	Albumina
Peso	----	0,63	-0,13	0,72	0,71	-0,21
Colesterol	0,78	----	0,36	0,89 **	0,82 *	0,58
Glicose	-0,79	-0,63	----	0,05	-0,04	0,58
Triacilgliceróis	-0,78	-0,35	0,45	----	0,98 **	0,29
Creatinina	0,39	-0,28	-0,35	-0,67	----	0,17
Albumina	0,49	0,56	-0,58	0,12	-0,08	----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 7 coelhos testemunhas normais e a diagonal inferior, em 5 coelhos testemunhas diabéticos.

² Quarenta dias após início da aplicação do aloxano.

4. DISCUSSÃO

4.1. Efeito da dose de aloxano na indução de diabetes em coelhos

Em muitos estudos sobre diabetes, com duração de várias semanas ou até meses, são utilizados animais cobaias, nos quais é induzido diabetes. Assim, ao ser aplicado aloxano, deve-se utilizar dose que seja suficiente para induzir o diabetes, mas não seja tão alta que possa matar os animais. A destruição da maioria das células β do pâncreas que secretam insulina produz alterações complexas e interrelacionadas com a bioquímica de carboidratos, lipídios e proteínas, equivalentes àquelas observadas no diabetes tipo 1 de humanos (CACINI et al., 1993).

Neste estudo, não houve relação linear entre as doses de aloxano e os níveis sanguíneos de glicose, triacilgliceróis e colesterol, devido a grande variabilidade da resposta dos coelhos a cada dose de aloxano. ZHAO (1987) também observou grande variabilidade quanto aos efeitos diabetogênicos do aloxano aplicado em coelhos. Uma possível explicação seria que uma mesma dose de aloxano pode ser suficiente para destruir grande número das células β do pâncreas, ou mesmo todas, em um animal, induzindo assim a hiperglicemia, ou mesmo matá-lo. Enquanto em outros animais, o número de células β destruídas seria pequeno, não sendo suficiente para induzir diabetes, o que implicaria em resistência ao aloxano.

Aos 4 dias após a aplicação do aloxano, 77,8% dos coelhos que receberam aloxano apresentavam-se diabéticos, indicando resistência ao aloxano em 22,2% deles. Não houve grandes diferenças nas percentagens de coelhos resistentes a diferentes doses de aloxano, variando de 20 a 28,7%. Em outros estudos, verificou-se que 20 a 43% dos coelhos apresentaram resistência ao aloxano, embora tenham sido considerados como diabéticos, coelhos com glicemia maior de 250 mg.dL⁻¹. Essa percentagem varia de acordo com a espécie de animal cobaia (MINNICH & ZILVERSMIT, 1989; HADOUR et al., 1998; McDOWELL et al., 1994; PEMBERTOM, 1970; MELLO & LUCIANO, 1995; MARCIANO, 1997; FRINHANI, 1998), podendo atingir até 100% em gatos (HATCHEL et al., 1986).

As doses de 90 e 105 mg.kg⁻¹ de aloxano, apesar de terem induzido diabetes em semelhantes percentagens de coelhos que as doses mais elevadas, causaram menor mortalidade e propiciaram maior número de sobreviventes diabéticos, sendo então recomendadas para a indução de diabetes em coelhos, em experimentos futuros. Em outros estudos, tem sido verificada mortalidade de 9,5 a 30% de coelhos que receberam doses de 90 a 100 mg.kg⁻¹ de aloxano (MINNICH & ZILVERSMIT, 1989; HADOUR et al., 1998; McDOWELL et al., 1994). Em outros animais, também houve variação da mortalidade com a aplicação de diferentes doses (PEMBERTOM, 1970; HATCHEL et al., 1986; BERTUGLIA et al., 1995; MELLO & LUCIANO, 1995; KIM et al., 1994; MARCIANO, 1997; FRINHANI, 1998).

O aloxano age especificamente nas células β das ilhotas pancreáticas, mais precisamente em sua membrana plasmática (GORRAY et al., 1983), induzindo inicialmente maciça liberação de insulina, cuja taxa posteriormente é reduzida abaixo dos níveis normais, o que irá acarretar hiperglicemia, que em coelhos, pode ocorrer dentro de 48 horas após a

aplicação do aloxano (WITMER et al., 1992). Essa alta taxa inicial de liberação de insulina pode causar hipoglicemia fatal (GORRAY et al., 1983; BHIMJI & MCNEILL, 1989). Para evitá-la é comum a administração de glicose nas primeiras 24 horas após a aplicação do aloxano. Para tanto, diversas são as doses e esquemas de aplicação reportados (HATTON et al., 1995; RICHARDSON et al., 1995; CONTRERAS et al., 1997; TEFAMARIAM et al., 1993; TILTON et al., 1989; McDOWELL et al., 1994; VARMA et al., 1980; BHIMJI & McNEILL, 1989). Segundo BHIMJI & McNEILL (1989), essa medida pode reduzir a mortalidade de 100% para menos de 10%.

Os 13 coelhos diabéticos sobreviventes apresentaram glicemia de 315,8 a 642,6 mg.dL⁻¹. Na literatura há registros de níveis de glicose plasmática em coelhos diabéticos sobreviventes, após a administração intravenosa de aloxano de 183 ± 15 mg.dL⁻¹ (HOSNY et al., 1997) a 566 ± 29 mg.dL⁻¹ (média ± erro-padrão) (BHIMJI & McNEILL, 1989).

No experimento citado na seção 2.2.2, foi usado a dose de 100 mg.kg⁻¹ de aloxano. Morreram 5,6% dos coelhos nos primeiros 5 dias e, dentre os sobreviventes, somente 25% dos coelhos ficaram diabéticos, com glicemia variando de 204 a 604 mg.dL⁻¹. Essa menor porcentagem de indução pode ser devida a diferenças na perícia dos aplicadores do aloxano ou ao fato dos coelhos não terem ficado em jejum nas 24 horas que antecederam a aplicação do aloxano. A glicose pode anular o efeito do aloxano, protegendo as células β das ilhotas da citotoxicidade do aloxano (BORG et al., 1979; CARTER & YOUNATHAN, 1962; GORRAY et al., 1983). Elevações variáveis e temporárias na glicemia devido ao estresse podem proteger contra o efeito tóxico do aloxano (GORRAY et al., 1983).

4.2. Efeito do flavonóide naringenina e fruta-de-lobo na glicemia de coelhos diabéticos.

Em ambos experimentos, não houve diferenças significativas com relação a quaisquer características, entre os tratamentos aplicados aos coelhos diabéticos, tanto pela comparação de médias quanto de coeficientes de regressão linear. Isto provavelmente se deve a alta variabilidade do peso e constituintes sangüíneos apresentada pelos coelhos que compunham um mesmo tratamento.

SUNDARAM et al. (1996) também não detectaram diferença significativa entre os tratamentos, embora tenham observado reduções substanciais na glicemia em coelhos diabéticos, usando formulações contendo plantas medicinais e preparações minerais com ação hipoglicemiante adicionada aos hipoglicemiantes orais, tolbutamida ou glibenzamida.

Segundo DALL'AGNOL & POSER (2000), a fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum*) possui efeito hipoglicemiante, atribuído ao conteúdo de polissacarídeos de seu fruto que além de retardarem o esvaziamento gástrico e, conseqüentemente, a absorção de glicose e outros metabólitos para a corrente sangüínea, também agem em sistemas endócrinos afetando a liberação de hormônios gastrointestinais e reduzindo os níveis plasmáticos de glicose. Um outro fator que pode estar envolvido no efeito hipoglicemiante do amido da fruta-de-lobo é a presença de um glicosídeo terpenóide, responsável pelo aumento da utilização de glicose (MARCIANO, 1997).

Outras espécies de *Solanaceae* estudadas apresentaram efeitos hipoglicemiantes diferentes. A diminuição da glicemia em ratos por extrato de pimentão (*Capsicum annuum* L.) foi atribuída à inibição do transporte intestinal da glicose e, ou, de seu metabolismo (IVORRA et al., 1989). Não apresentaram efeito hipoglicemiante o jiló (*S. gilo*), em ratos com diabetes induzido por aloxano, provavelmente devido a seu baixo teor de fibra (SILVA et al., 1998), e *S. torvum*, em pacientes com diabetes tipo 2. A suplementação com 17,6 g de pó de fibra de *S. torvum* não alterou a concentração plasmática de glicose, lipídios, proteínas glicosiladas,

aminoácidos totais ou ácido urônico (IYER et al., 1992). A administração oral de sementes de *Cuminum nigrum* L. (Umbelliferae), que contém 8% de flavonóides apresentou efeito hipoglicemiante em coelhos diabéticos, o qual teve início 2 horas após sua administração (AHMAD et al., 2000).

Nas testemunhas normais, em ambos experimentos, entre o início e final do experimento, foi observada variação, embora menor que em coelhos diabéticos, estatisticamente significativa para alguns constituintes sangüíneos. Isto é devido à variabilidade amostral (erro experimental) dos constituintes sangüíneos na testemunha normal ter sido muito menor que nos diabéticos. Isto é uma forte evidência que não houve erro nas determinações (Quadros 5 e 8).

No primeiro experimento, as testemunhas normais apresentaram aumento da glicemia que porém, permaneceu dentro dos limites considerados normais. Os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triacilgliceróis, observados nessas testemunhas, em ambos os experimentos, foram próximos daqueles observados em outros estudos: $142,0 \pm 35,0$; $76,0 \pm 2,2$ e $77,0 \pm 9,0$ mg.dL⁻¹, respectivamente (HUANG et al., 1993; MINNICH & ZILVERSMIT 1989). Contudo, dependendo da dieta, os níveis de triacilgliceróis e colesterol podem atingir 263 ± 78 e 1793 ± 342 mg.dL⁻¹, respectivamente (MINNICH & ZILVERSMIT 1989).

No segundo experimento, houve significativa redução na glicemia final, em relação à inicial, da testemunha diabética. Em outros estudos também foi observada a redução da glicemia em coelhos diabéticos sem tratamentos, de $426,5 \pm 20,08$ mg.dL⁻¹ (média \pm erro-padrão) para $385,02 \pm 24,15$ mg.dL⁻¹, num período de 8 horas (SUNDARAM et al., 1996) e de $340 \pm 1,4$ para $310 \pm 1,3$ mg.dL⁻¹, em um período de 24 horas (ABDEL-HASSAN et al., 2000).

As variações na glicemia, ao longo de ambos experimentos, apresentadas por alguns coelhos, também foram verificadas por PESSOTO et al. (1997), que aplicaram 100 mg.kg⁻¹ de aloxano em coelhos e observaram que alguns animais apresentavam, ao longo de 4 meses, variação nos níveis de glicose, apesar de sucessivas aplicações de aloxano. Enquanto outros, deixaram de ser diabéticos ao final do experimento.

No decorrer de ambos os experimentos, 8 dentre 23 coelhos diabéticos tiveram sua glicemia drasticamente reduzida. Quatro desses coelhos receberam naringenina e os outros 4 eram testemunhas, evidenciando que essa redução não foi devido ao flavonóide. Em 5 desses coelhos, a redução na glicemia final em relação à inicial foi cerca de 50% e nos outros 3, de aproximadamente 25%. Em 4 coelhos a glicemia retornou a níveis normais. De modo geral, esses coelhos apresentavam as menores glicemias iniciais, dentre os diabéticos. O aloxano produziu diabetes em porquinhos-da-índia, mas os sinais do diabetes desapareceram 2 semanas depois (GORRAY, 1986a). Em coelhos que receberam aloxano, ZHAO (1987) observou a ocorrência de hiperglicemia apenas temporariamente.

Esses resultados sugerem que coelhos com diabetes severa, induzida por aloxano, podem apresentar recuperação espontânea. Estudos histopatológicos seriam necessários para a confirmação.

Uma possível explicação para essa redução da glicemia é que nem todas as células β pancreáticas desses 8 coelhos tivessem sido destruídas pelo aloxano, ocorrendo regeneração a partir das células que permaneceram intactas. Logothetopoulos (1972) citado por VAN ASSCHE (1979), demonstrou a existência da capacidade regenerativa das células β pancreáticas, embora limitada. A regeneração de ilhotas e aumento da tolerância à glicose foram observados por Yonemura et al. (1984), citados por BAEZA et al. (1996), após a administração de inibidores de polissintetase, como a nicotinamida, em ratos que tiveram 90% do pâncreas retirados cirurgicamente. Em porquinhos-da-índia, GORRAY (1986b) observou que após a aplicação do aloxano, o nível de insulina decresceu em 24 horas, retornando ao

normal 72 horas após a aplicação. Nesse mesmo tempo, o volume das células β de ilhotas pancreáticas, que havia sido reduzido, retornou ao normal, devido à regranulação ou regeneração.

Diversos autores observaram aumento dos níveis de insulina e, ou, redução da glicemia em animais diabéticos, tratados com chá preto (GOMES et al., 1995) ou plantas medicinais (LAMELA et al., 1986; ABDEL-BARRY et al., 1997; AJABNOOR & TILMISANY, 1988). Esses autores sugerem que isso se deve à sobrevivência de células β e a possibilidade de regeneração das mesmas, após a aplicação de aloxano ou estreptozotocina, beneficiadas pela ação de flavonóides. Segundo ZARZUELO et al. (1996), o efeito antioxidante dos flavonóides poderia contribuir para a regeneração das células β observada, após a administração oral, durante 20 dias, de luteolina 5-rutinoside a ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. Houve um aumento da insulina pancreática e do conteúdo de DNA comparado ao grupo controle.

No primeiro experimento, em todos os tratamentos, exceto o de fruta-de-lobo, houve ganho significativo de peso, e no segundo, somente a testemunha normal ganhou peso. O ganho de peso observado nos coelhos normais era esperado, pois acredita-se que os mesmos apresentavam níveis de insulina normais. A insulina facilita o transporte de aminoácidos para as células, particularmente para o músculo, onde estimula a síntese protéica, e interfere na replicação e na diferenciação celular, resultando em ganho de peso (PAGANO et al., 1998; MARZZOCO & TORRES, 1999).

Quase todos os coelhos com glicemia superior a 500 mg.dL^{-1} perderam peso. Contudo a maioria dos coelhos diabéticos ganhou peso. Os 8 coelhos diabéticos que apresentaram grande redução da glicemia, foram os que tiveram maior ganho de peso. PAGANO et al. (1998) e WITMER et al. (1992) também verificaram ganho de peso em coelhos diabéticos, embora menor que o de coelhos normais. Supõe-se que o ganho de peso seja devido ao fato de que o nível de insulina desses coelhos não era muito menor que o normal. Coelhos normais e diabéticos tiveram níveis de insulina de $39,6 \pm 2,9$ e $29,9 \pm 5,6 \mu\text{U.mL}^{-1}$ e de glicose de 93 ± 6 e $566 \pm 29 \text{ mg.dL}^{-1}$ (média \pm erro-padrão), respectivamente (BHIMJI & McNEILL, 1989).

GORRAY et al. (1986b) mostraram que animais tratados com aloxano não ganharam peso nas primeiras 96 horas, período em que os níveis de insulina estavam menores que nos animais controle. Quando os níveis de insulina se estabilizaram, entre 96 e 120 horas, houve ganho de peso, com consumo alimentar semelhante ao dos animais controle.

A aplicação de 200 mg.kg^{-1} de aloxano em porquinhos-da-índia não produziu efeito no peso, no primeiro dia. Porém 14 dias após, os animais controle e tratados com aloxano tiveram aumento de 30% em relação ao peso antes da aplicação. Concomitantemente, o nível de insulina foi reduzido 30% no primeiro dia e retornou ao normal no 14^o dia, nos animais que receberam aloxano. Contrariamente, os animais que receberam a mesma dose de estreptozotocina, tiveram redução de peso de 25% em relação ao peso inicial e apresentaram declínio progressivo nos níveis de insulina, atingindo níveis menores de 40%, no 14^o dia (GORRAY et al., 1986a).

No presente estudo, não houve ganhos significativos de peso nos coelhos diabéticos que receberam amido de fruta-de-lobo. Reis et al. (1996), citados por DALL'AGNOL & POSTER (2000), observaram perda de peso em animais 9 dias após tratamento com fruta-de-lobo. MARCIANO (1997) também observou que quanto maior a percentagem de amido de fruta-de-lobo na dieta de ratos, menor foi o ganho de peso. SÁ et al. (2000) não observaram alteração de peso em ratos ou camundongos recebendo fruta-de-lobo, embora tenham observado perda

de peso na próstata de camundongos, e devido a isso, sugeriram a ocorrência de efeito tóxico no sistema reprodutor masculino.

O colesterol, um esteroide produzido principalmente no fígado a partir do acetato, é transformado em ácidos biliares que são eliminados na bile. Tais ácidos são reabsorvidos no intestino delgado, voltando ao fígado. Essa circulação entero-hepática parece controlar a produção de colesterol por meio de um mecanismo de auto-regulação negativa. O colesterol total é constituído de colesterol livre e esterificado. A esterificação é sua combinação com ácidos graxos (MILLER, 1986). Em humanos, os valores normais de colesterol total, no sangue, variam entre 150 a 250 mg.dL⁻¹. Nos diabéticos, os níveis são elevados, podendo chegar a 3600 mg.dL⁻¹ (LIMA, 1985). Em coelhos, há registros dos níveis de colesterol em normais e diabéticos de 71 ± 6 e 227 ± 27 mg.dL⁻¹ (média ± erro-padrão), respectivamente (BHIMJI & McNEILL, 1989).

Os níveis de triacilgliceróis, ésteres de ácidos graxos com glicerol, em humanos normais, variam de 50 a 150 mg.dL⁻¹, sendo maiores nos diabéticos (LIMA, 1985). Em coelhos normais e diabéticos são de 55 ± 6 e 179 ± 14 mg.dL⁻¹ (média ± erro-padrão), respectivamente (BHIMJI & McNEILL, 1989).

Em ambos experimentos, quase todos os coelhos diabéticos apresentaram altos e variáveis níveis de triacilgliceróis e colesterol, até cerca de 12000 e 600 mg.dL⁻¹, respectivamente, na primeira determinação após a aplicação do aloxano. A determinação da concentração sangüínea dos constituintes sangüíneos foi feita por métodos colorimétricos, e a coloração branca do soro pode ter interferido nos valores. Nos coelhos diabéticos, no início do experimento 1, observou-se alta correlação entre os níveis de glicemia, triacilgliceróis e colesterol. A correlação entre triacilgliceróis e colesterol foi alta no início e baixa no final dos experimentos.

Níveis de triacilgliceróis plasmáticos variando de 100 a 5500 mg.dL⁻¹ foram observados em coelhos que receberam a mesma quantidade de aloxano. Em coelhos diabéticos, os níveis de colesterol e triacilgliceróis foram aproximadamente 3000 e 500 a 7500 mg.dL⁻¹, respectivamente, após 3 a 4 semanas com dietas contendo esses constituintes (MINNICH & ZILVERSMIT, 1989).

Os elevados níveis iniciais de triacilgliceróis e colesterol de todos coelhos diabéticos, recebendo ou não tratamento, foram reduzidos, retornando a níveis normais, entre 10 a 30 dias após a aplicação do aloxano. Apenas 1 coelho apresentou aumento destes constituintes sangüíneos. Esse coelho, cujos dados não foram considerados na análise deste estudo, ao ser sacrificado no dia da última coleta de sangue, apresentava características de problemas renais. O rim tinha cor e tamanho anormais.

Utilizando-se cultura de células de hepatócitos de ratos, a síntese e secreção de lipídios foram estimuladas em baixas concentrações de insulina. Contudo, em altas concentrações, a síntese continuou a ser estimulada e a secreção foi reduzida (BJÖRNSSON et al., 1992). BHIMJI & McNEILL (1989) constataram que todos coelhos diabéticos tiveram elevações significativas nos níveis de colesterol e triacilgliceróis. Após a administração de 100 ou 150 mg.kg⁻¹ de aloxano, coelhos diabéticos apresentavam níveis similares aos coelhos normais, de colesterol plasmático e de triacilgliceróis (PAGANO et al., 1998; HADOUR et al., 1998). Este último realizou a coleta de sangue 48 horas após a aplicação do aloxano. Talvez o período de 48 horas não tenha sido suficiente para desenvolver a hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. De 18 coelhos hiperglicêmicos e hiperlipidêmicos somente 4 apresentavam-se hiperlipidêmicos 1 ano após a administração de aloxano (WITMER et al., 1992).

Embora os tratamentos utilizados neste estudo não demonstraram efeito significativo na redução dos níveis de triacilgliceróis e colesterol, outros estudos verificaram esse efeito com o uso de plantas medicinais e produtos vegetais (HUANG et al., 1993; IIZUKA et al., 1998). KUROWSKA et al. (1997) constataram que coelhos hipercolesterolêmicos recebendo suco de laranja ou uva, que representam importantes fontes de naringenina, tiveram níveis de colesterol-LDL menores (43 e 32%, respectivamente) que os controles.

No segundo experimento, avaliaram-se também os níveis de albumina e creatinina. A albumina, uma proteína plasmática, cuja síntese ocorre no fígado, desempenha funções biológicas como ligação e transporte de numerosas substâncias tais como: íons metálicos, aminoácidos, hormônios, ácidos graxos, bilirrubina, enzimas, metabólitos ou produtos tóxicos. Desempenha importante papel na manutenção da pressão osmótica devido ao seu peso molecular relativamente baixo. Em humanos, os níveis plasmáticos normais variam de 3,5 a 5,0 g.dL⁻¹ (MILLER, 1986; LIMA, 1985).

A creatinina é o elemento nitrogenado do sangue com concentração menos variável. É um anidrido da creatina, que é um derivado da guanina. No organismo, em condições normais, creatina se transforma em creatinina. (LIMA, 1985). Durante a contração muscular, a fosfocreatina libera creatina, ácido fosfórico e mais 1100 calorias. Durante o repouso, a creatina reverte em fosfocreatina, obtendo energia da decomposição do glicídio no músculo (LEHNINGER, 1985; MARZZOCO & TORRES, 1999). A creatinina é eliminada do plasma por filtração glomerular e não é reabsorvida nos túbulos em grau significativo. A concentração de creatinina plasmática é interpretada como taxa de filtração glomerular (MILLER, 1986; MARZZOCO & TORRES, 1999).

Durante o período experimental, houve oscilação nos níveis de creatinina. Somente os coelhos testemunha normal apresentaram aumento significativo, devido à pequena variabilidade entre os indivíduos desse tratamento. Com exceção de 1 coelho diabético, todos os demais apresentaram níveis de creatinina entre 1 a 2 mg.dL⁻¹. Estes são os limites normais em humanos (LIMA, 1985; MILLER, 1986). Segundo McDOWELL et al. (1994), os níveis de creatinina plasmática de coelhos diabéticos induzidos com 150 mg.kg⁻¹ de aloxano na veia da orelha, foram maiores (1,3 ± 0,1 mg.dL⁻¹) que os níveis de coelhos normais (0,9 ± 0,1 mg.dL⁻¹) (média ± erro-padrão), corroborado por PAGANO et al. (1998). O medicamento daflon não afetou os níveis de creatinina de pessoas diabéticas (VALENSI et al., 1996).

Neste estudo, houve redução significativa do nível de albumina, nos coelhos diabéticos. Segundo WITMER et al. (1992), a taxa de catabolismo de albumina de coelhos diabéticos foi 25 a 30% menor que nos coelhos controles. A patogênese de doenças vasculares no diabetes envolve alterações no mecanismo homeostático como, alterações na função plaquetária, na função celular endotelial plaquetária e no balanço homeostático, particularmente das proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação. O fígado de ratos diabéticos tem capacidade reduzida para sintetizar e secretar certas proteínas plasmáticas, particularmente albumina, *in vitro* e *in vivo*. Para manter um balanço homeostático na circulação, a taxa de catabolismo dessas proteínas deve ser proporcionalmente reduzida em mamíferos diabéticos (HATTON et al., 1995).

CAPÍTULO 2

EFEITO DA DIETA E DO FLAVONÓIDE NARINGENINA NA GLICEMIA E OUTROS CONSTITUINTES SANGÜÍNEOS DE RATOS DIABÉTICOS

1. INTRODUÇÃO

A terapia do diabetes, com o objetivo de manter a glicemia em níveis normais e evitar as complicações secundárias, inclui atividade física, dieta adequada, insulina e medicamentos (HÁ & LEAN, 1998).

Os medicamentos hipoglicemiantes orais como biguanidas e sulfoniluréias são capazes de manter a normoglicemia e retardar o surgimento de complicações do diabetes. Porém, em 25% dos pacientes, a eficiência desses medicamentos, inicialmente alta, é perdida com o uso prolongado e, em 3% dos pacientes, ocorrem efeitos adversos. A hipoglicemia é um importante efeito adverso das sulfoniluréias, podendo ser fatal (SUNDARAM et al., 1996).

Radicais livres de oxigênio, altamente reativos, causam dano às células β pancreáticas, induzindo ou agravando o diabetes e podem ainda contribuir para o surgimento de complicações secundárias. Atualmente, muitos estudos têm focado o efeito de compostos antioxidantes, como carotenóides e flavonóides, na terapia e prevenção de diversas doenças (HÁ & LEAN, 1998).

O flavonóide naringenina tem nos citros uma de suas principais fontes (BRONNER & BEECHER, 1995). Como o Brasil é o segundo maior produtor mundial de citros (FAO, 2000), a naringenina pode vir a ser um dos principais flavonóides disponíveis na dieta.

Este estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da naringenina na glicemia e nos níveis de outros constituintes sangüíneos de ratos com diabetes induzido por aloxano.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Nutrição Experimental e de Biofármacos dos Departamentos de Nutrição e Saúde (DNS) e de Bioquímica e Biologia Molecular, respectivamente, da Universidade Federal de Viçosa.

Estudaram-se os efeitos, na glicemia e também em outros constituintes sanguíneos de ratos diabéticos, do flavonóide naringenina e de duas dietas: Dieta AIN-93G (REEVES et al., 1993) (dieta básica) e AIN-93G rica em sacarose (dieta modificada) (Quadro 12). Realizaram-se 3 experimentos fatoriais, com 2 níveis (Quadro 13). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo cada rato uma unidade experimental. Utilizaram-se ratos albinos, machos da raça Wistar, adultos, pesando entre 200 e 300 gramas, provenientes do biotério do DNS. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de arame, onde receberam alimento e água destilada *ad libitum*, em comedouros e bebedouros individuais, em ambiente com fotoperíodo de 12 horas e temperatura na faixa de 22 a 24°C. Após período de adaptação de 2 a 4 dias, foi administrada por via intravenosa, visando a obtenção de ratos diabéticos, suspensão de aloxano (2,4,5,6-tetraoxoexaidropirimidina monoidratado) (Sigma®) a 150 mg.mL⁻¹, tendo como veículo solução fisiológica de NaCl 0,9%. Essa alta concentração da suspensão foi utilizada com o objetivo do volume injetado ser inferior a 0,2 mL. Dose de aloxano de 60 mg.kg⁻¹ de peso corporal foi aplicada após um período de jejum de 16 horas, na veia lateral da cauda. Para tal, utilizaram-se seringas descartáveis de 1 ml, com agulhas hipodérmicas. O animal foi contido em um imobilizador, constituído de uma seção de tubo PVC com cerca de 20 cm de comprimento, tendo uma tampa de encaixe perfurada em uma das extremidades para a circulação do ar e, na extremidade oposta, outra tampa perfurada no centro para a passagem da cauda do animal.

A glicemia foi determinada pelo método enzimático de glicose oxidase com o kit Biolab® utilizando-se o analisador multiparamétrico automático Alizé®. Foi retirado cerca de 1 mL de sangue da cauda de cada rato por incisão na sua extremidade final. O sangue foi coletado gota a gota em tubos de Duran e centrifugado a 7100 x g durante 15 min. O soro sobrenadante foi analisado. Concomitantemente, foram determinados os níveis de triacilgliceróis, creatinina, albumina e colesterol total, doravante referido apenas como colesterol. A determinação dos triacilgliceróis séricos foi enzimática. A lipase degrada os triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos. O glicerol obtido, reage com ATP, em presença da glicerolquinase, formando glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetonafosfato, pelo glicerol-3-fosfato oxidase, liberando água oxigenada. Esta, juntamente com paraclorofenol e amino 4 antipirina, em presença da peroxidase, transforma-se no cromógeno que absorve em 505 nm. A determinação da concentração sanguínea de creatinina consiste em medir o composto formado durante 1 minuto da reação entre a creatinina e o ácido pícrico, que absorve em 492 nm. A albumina sérica foi quantificada colorimetricamente com verde de bromo cresol, tampão succinato e mertiolate de sódio e

Quadro 12 - Composição (%) das dietas modificada e básica AIN-93G, formulada para roedores em fase de crescimento, gestação e lactação

Ingredientes	Básica	Modificada
Caseína	20,00	20,00
Sacarose	10,00	47,95
Óleo de soja	7,00	7,00
Fibra (celulose microfina)	5,00	5,00
Mistura de minerais *	3,50	3,50
Mistura de vitaminas *	1,00	1,00
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Amido dextrinizado	13,20	----
Amido de milho (maisena)	39,75	15,00

* Mistura de minerais e de vitaminas segundo AIN-93G-MX e AIN-93G-VX, respectivamente (REEVES et al., 1993).

Quadro 13 – Tratamentos e número de ratos em cada experimento

Tratamentos	Número de animais		
	Experimento		
	1	2	3
Testemunha normal + dieta básica ¹	5	5	---
Diabéticos (testemunha) + dieta básica	5	6	5
Diabéticos + naringenina + dieta básica	5	6	5
Testemunha normal + dieta modificada ²	5	5	---
Diabéticos (testemunha) + dieta modificada	8	7	8
Diabéticos + naringenina + dieta modificada	6	8	8

¹ Dieta AIN – 93G (vide Quadro 12).

² Dieta AIN – 93G modificada (com 47,95% de sacarose).

analisados no comprimento de onda de 628 nm. A determinação colorimétrica do colesterol total baseia-se na transformação do colesterol esterificado em colesterol e ácidos graxos, mediado pela colesterol esterase. O colesterol formado é oxidado pela colesterol oxidase em colesteno-4-ona-3, liberando água oxigenada que juntamente com o fenol e amino 4 antipirina, pela ação da peroxidase, são transformados no cromógeno que absorve em 500 nm.

Semanalmente foram determinados o peso e o consumo alimentar de cada rato. A cada dia, pela manhã, retirava-se o comedouro da gaiola de cada rato, à exceção das testemunhas, introduzindo-se novo comedouro contendo cerca de 2 g de dieta adicionada de 20 mg de naringenina. Após os ratos terem consumido toda essa mistura, recolocava-se o comedouro contendo somente a dieta.

2.1. Experimento 1

Utilizaram-se 82 ratos, onde metade recebeu dieta básica e metade, dieta modificada. Administrou-se aloxano em 36 ratos de cada dieta e os outros 10 constituíram a testemunha normal. Nove dias após, avaliou-se a glicemia. Os ratos que receberam aloxano e apresentaram glicemia menor que 115 mg.dL⁻¹ foram descartados, enquanto os demais, em

cada dieta, foram divididos em 2 tratamentos, que iniciaram no dia seguinte: os que receberam 20 mg de naringenina e a testemunha diabética.

Aos 8, 15 e 29 dias após o início da administração de naringenina, foi realizada a coleta de sangue da cauda do rato e a determinação da concentração dos constituintes sangüíneos.

2.2. Experimento 2

Utilizaram-se 80 ratos, onde metade recebeu dieta básica e metade, dieta modificada. Administrou-se aloxano em 35 ratos de cada dieta e os outros 10 constituíram a testemunha normal. Visando evitar hipoglicemia nas primeiras 24 horas após a injeção do aloxano, foram adicionadas 2 g de sacarose aos comedouros dos ratos que recebiam dieta básica, 4 e 8 horas após a injeção do aloxano. Seis dias após, avaliou-se a glicemia. Os ratos que receberam aloxano e apresentaram glicemia menor que 120 mg.dL⁻¹ foram descartados, enquanto os demais, em cada dieta, foram divididos em 2 tratamentos, iniciados no dia seguinte: a testemunha diabética e os que receberam 20 mg de naringenina adicionadas à dieta, diariamente.

Aos 7, 14 e 27 dias após o início da administração de naringenina, foi realizada a coleta de sangue e determinação dos constituintes sangüíneos. Após essa última coleta, 12 ratos (6 recebendo dieta básica e 6 recebendo dieta modificada) que receberam apenas aloxano tiveram as dietas trocadas, ou seja, aqueles que haviam recebido dieta básica passaram a receber a dieta modificada, e vice versa. Quatorze dias após essa troca, determinaram-se os constituintes sangüíneos desses ratos.

2.3. Experimento 3

Aplicou-se aloxano em 50 ratos, dos quais 25 receberam dieta básica e os outros 25 dieta modificada. Na tentativa de evitar a hipoglicemia inicial que pode ocorrer logo após a aplicação do aloxano, todos os ratos receberam soro glicosado (0,9% de NaCl e 10% de glicose) em substituição à água destilada, por 24 horas. Oito dias após, avaliou-se a glicemia. Os ratos que apresentaram glicemia menor que 120 mg.dL⁻¹ foram descartados, enquanto os demais foram divididos em 2 grupos, constituindo 2 tratamentos, iniciados no dia seguinte: um grupo foi a testemunha diabética e o outro recebeu 20 mg de naringenina adicionadas à dieta, diariamente.

Aos 6, 12 e 26 dias após o início da administração de naringenina, foi realizada coleta de sangue e determinação da concentração dos constituintes sangüíneos de todos os ratos conforme descrito anteriormente. Após essa última coleta, 12 ratos que não receberam naringenina tiveram as dietas trocadas, ou seja, aqueles que haviam recebido dieta básica passaram a receber a dieta modificada, e vice versa. Quatorze dias após essa troca, determinaram-se os constituintes sangüíneos desses ratos.

2.4. Análises estatísticas

Todos os delineamentos foram inteiramente casualizados com 4 tratamentos e a análise dos dados foi fatorial.

Foi feita análise de variância de medidas repetidas, entre os tratamentos e dietas aplicados aos ratos diabéticos, quanto ao peso e constituintes sangüíneos. O experimento foi

considerado como delineamento em parcelas subdivididas, tendo as épocas de avaliação como subparcelas.

Para as características que apresentaram alto coeficiente de variação (maior que 30%), procedeu-se a análise de covariância da característica ao final do experimento, considerando como covariável o seu valor no início do experimento, objetivando reduzir o erro experimental.

A análise de covariância (ANCOVA) dos constituintes sangüíneos e do peso ao final do experimento, considerando como covariável a respectiva variável determinada no início do experimento objetiva reduzir o erro experimental. Entretanto, para algumas características, não foi possível realizar análise de covariância devido a não homogeneidade dos coeficientes de regressão (de todos os tratamentos) da variável em relação à covariável.

As análises de correlação objetivaram constatar se alguns dos constituintes seria altamente correlacionado de forma consistente; em outros estudos, seria analisado apenas um deles.

Todas análises estatísticas foram processadas com o programa "Statistica for Windows 5.5" (STATSOFT, 2000).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

Foi avaliado, durante 30 dias, o efeito do flavonóide naringenina e de duas dietas nos constituintes sangüíneos, peso e consumo alimentar de ratos, nos quais foi previamente induzida hiperglicemia por meio da aplicação de aloxano.

Aos ratos que não receberam aloxano (testemunha normal), a dieta modificada proporcionou maior nível de albumina no soro dos animais, ao final do experimento que a dieta básica (Quadro 14).

Dentre os ratos que receberam aloxano, em avaliação feita 7 dias após, a dieta básica proporcionou maior consumo alimentar e a dieta modificada, nível mais elevado de creatinina. Quanto aos demais constituintes sangüíneos não houve diferenças entre as médias das duas dietas (Figura 7). Os valores de creatinina foram $0,81 \pm 0,09$ mg.dL⁻¹ e $1,01 \pm 0,13$ mg.dL⁻¹ para as dietas básica e modificada, respectivamente.

Sete dias após a aplicação de aloxano em 72 ratos, dentre os 36 que consumiram dieta básica, 25% haviam morrido, antes da primeira determinação da glicemia, e 51,9% dos sobreviventes apresentaram-se diabéticos (glicemia > 120 mg.dL⁻¹). Dentre os que consumiram dieta modificada, 11,1% morreram e 75% dos sobreviventes apresentaram-se diabéticos (Quadro 15). Selecionaram-se 24 ratos diabéticos para estudar os efeitos das dietas e da naringenina.

A média dos constituintes sangüíneos, peso e consumo alimentar, para cada tratamento, no decorrer do experimento, é apresentada nas Figuras 8 e 9. A variação percentual em relação a testemunha diabética que consumiu dieta básica é apresentada no Quadro 16.

Comparando-se os valores de cada característica, no início e no final do experimento, verificou-se que a testemunha normal apresentou aumento de peso e do nível de colesterol e diminuição do nível de albumina, independente da dieta, e aumento do nível de triacilgliceróis com o uso da dieta modificada. Em ratos diabéticos, o peso aumentou, exceto em ratos que consumiram dieta básica e naringenina, a glicemia não apresentou variação e o nível de albumina diminuiu. Houve diminuição do nível de creatinina apenas em ratos que consumiram dieta modificada e naringenina (Quadro 17).

Foi feita análise de variância de medidas repetidas, entre os tratamentos e dietas aplicados aos ratos diabéticos, quanto ao peso e constituintes sangüíneos. O experimento foi considerado como delineamento em parcelas subdivididas, tendo as épocas de avaliação como subparcelas (Quadro 18). Para as características peso, glicemia e nível de creatinina e triacilgliceróis, as quais apresentaram alto coeficiente de variação (maior que 30%), procedeu-se a análise de covariância da característica ao final do experimento, considerando como covariável o seu valor no início do experimento, objetivando reduzir o erro experimental (Quadro 19). Não foi possível realizar análise de covariância da glicemia devido a não

homogeneidade dos coeficientes de regressão (de todos os tratamentos) da variável em relação à covariável.

Foi estimada a correlação entre peso, consumo alimentar e os constituintes sangüíneos de ratos testemunhas normais e testemunhas diabéticas, no início (Quadro 20) e no final do experimento (Quadro 21).

Quadro 14 – Efeito das dietas no peso (g), consumo alimentar (g) e constituintes sangüíneos (mg.dL^{-1}) de ratos que não receberam aloxano (testemunha normal) (experimento 1)

	Dias após início dieta	Dieta		T (teste t)	Probabilidade
		Básica	Modificada		
Peso	2	280,0	274,4	0,319	0,758
	42	355,0	369,3	-0,558	0,594
Consumo alimentar total	3 a 41	630,2	581,2	0,697	0,506
Creatinina	10	0,82	0,71	0,577	0,580
	42	0,74	0,69	0,491	0,638
Colesterol	10	101,8	108,1	-0,705	0,501
	42	139,2	138,1	0,081	0,938
Triacilgliceróis	10	98,9	114,7	-0,925	0,382
	42	134,1	158,8	-1,107	0,305
Glicose	10	121,7	147,5	-2,793	0,027
	42	151,1	129,7	0,568	0,599
Albumina ¹	10	4,78	4,85	-0,710	0,498
	42	4,37	4,60	-2,625	0,034

¹ Albumina em g.dL^{-1} .

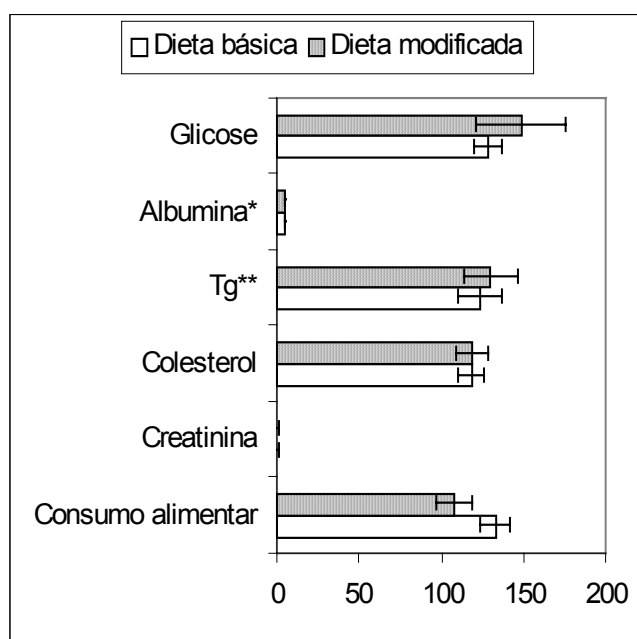


Figura 7 – Efeito das dietas no consumo alimentar (7 dias) (g) e constituintes sangüíneos (mg.dL^{-1} de sangue) de ratos sobreviventes, 7 dias após aplicação de aloxano (9 dias para glicose). A barra representa o I.C. $(\mu)_{0,95}$. 27 ratos receberam dieta básica e 32, dieta modificada. Houve diferenças entre as médias das duas dietas pelo teste t ($P < 0,05$), com relação ao consumo alimentar e creatinina (experimento 1). (* g.dL^{-1} , ** triacilgliceróis).

Quadro 15 – Número de ratos mortos e diabéticos (experimento 1)

Aloxano	Dieta	Número de Ratos								
		Total	Mortos ¹	Tratamento ²	Glicemia > 120 mg.dL^{-1}					
					Dias após início da administração do flavonóide					
-1	8	15	29							
Não	Básica	5	0	TN	1	2/4	2/4	2/5		
	Modificada	5	0	TN	5	1/5	1/4	3/4		
Sim	Básica	36	09	TD	14 ³	3/5	2/5	3/5		
				Naringenina		3/5	4/5	3/5		
	Modificada	36	04	TD	24 ³	7/8	7/8	7/8		
				Naringenina		4/5	5/6	5/6		

¹ Na primeira semana após a aplicação do aloxano, antes da determinação da glicemia inicial.

² TN, TD: testemunhas normal e diabética, respectivamente.

³ Foram selecionados 10 e 14 ratos que consumiram dieta básica e modificada, respectivamente, os demais foram descartados.

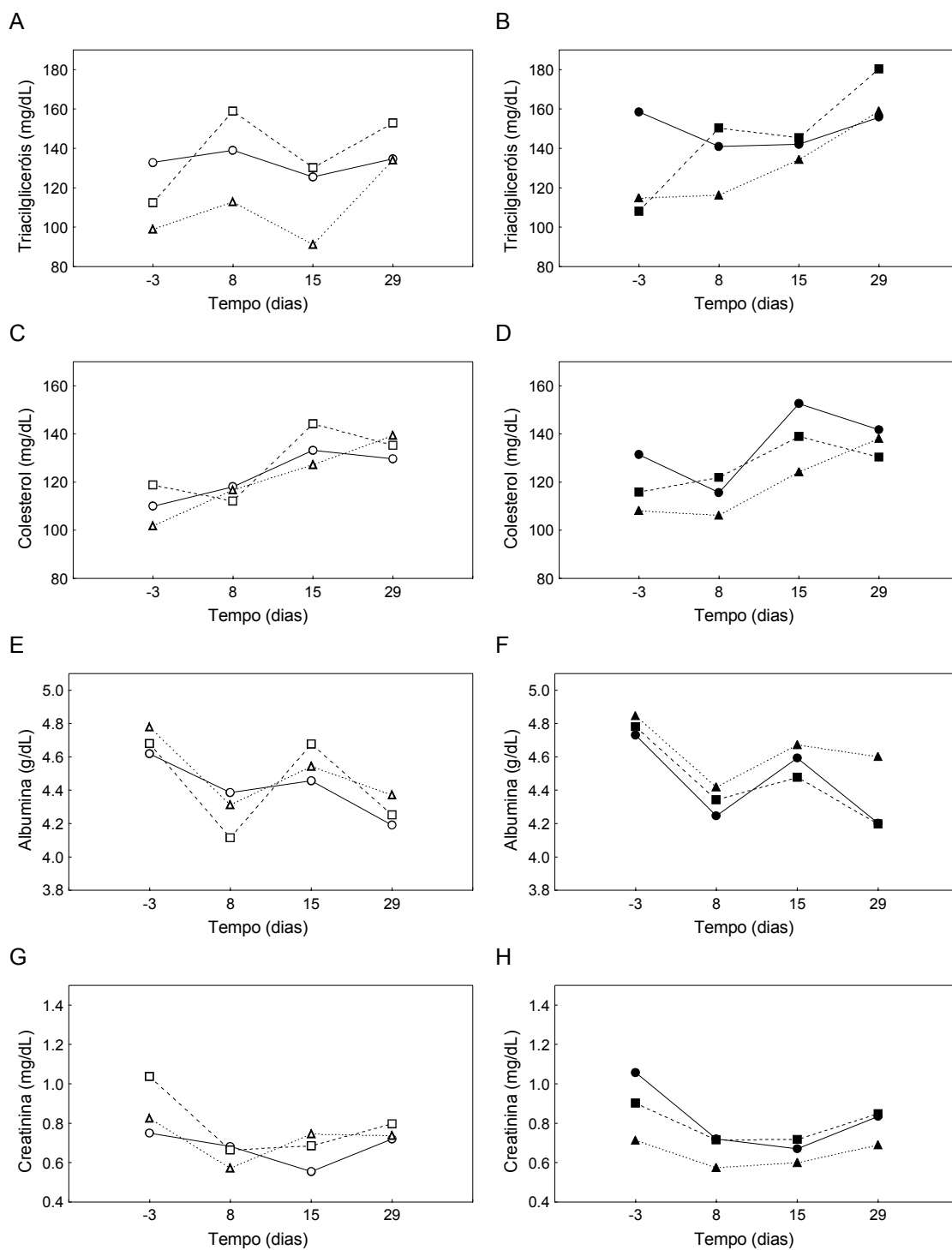


Figura 8 - Médias dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis (A e B), colesterol (C e D), albumina (E e F) e creatinina (G e H), em ratos com dieta básica (símbolo vazio) ou modificada (símbolo cheio) no experimento 1. O dia zero corresponde ao início da administração do flavonóide (O - naringenina; □ - testemunha diabética e Δ - testemunha normal).

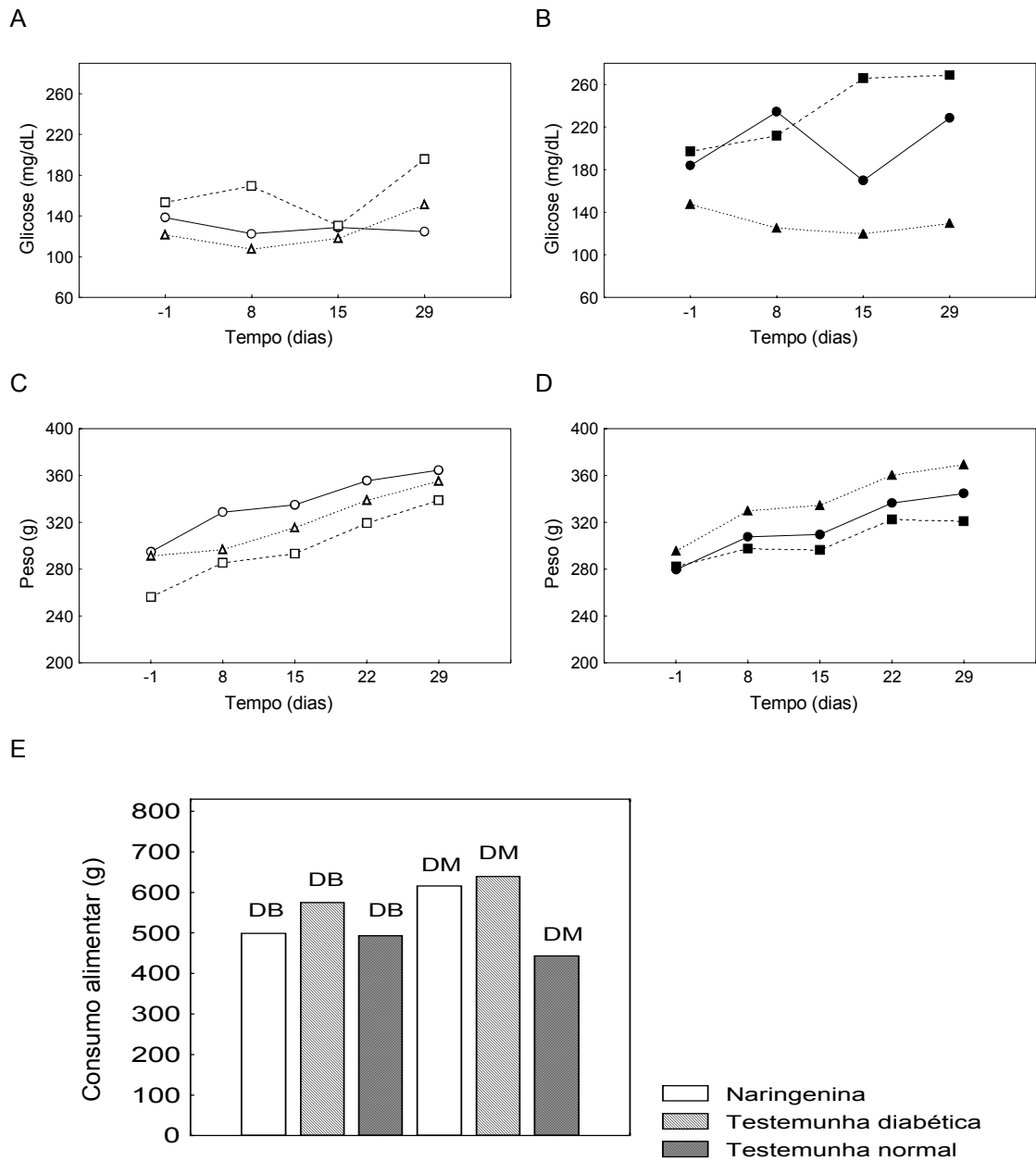


Figura 9 - Médias dos níveis de glicose (A e B), peso (C e D) (O - naringenina; □ - testemunha diabética e Δ - testemunha normal) e consumo alimentar total (E) em ratos alimentando-se de dieta básica (DB, símbolo vazio) ou modificada (DM, símbolo cheio), no experimento 1. O dia zero corresponde ao início da administração do flavonóide.

Quadro 16 – Variação média (%) do peso e constituintes sanguíneos de ratos diabéticos, em relação à testemunha diabética que recebeu dieta básica (experimento 1)

Tratamentos	Tempo (dias) ¹			
	8	15	22	29
	Peso			
Dieta modificada	4,24	1,01	1,07	-5,33
Dieta básica + naringenina	15,14	14,18	11,34	7,62
Dieta modificada + naringenina	7,80	5,49	5,42	1,68
	Creatinina			
Dieta modificada	7,68	4,59		6,63
Dieta básica + naringenina	2,71	-19,24		-9,55
Dieta modificada + naringenina	8,43	-2,33		4,90
	Colesterol			
Dieta modificada	8,69	-3,71		-3,68
Dieta básica + naringenina	5,31	-7,67		-4,14
Dieta modificada + naringenina	3,14	5,79		4,76
	Triacilgliceróis			
Dieta modificada	-5,42	11,67		17,94
Dieta básica + naringenina	-12,48	-3,58		-11,90
Dieta modificada + naringenina	-11,29	9,14		1,89
	Glicose			
Dieta modificada	25,08	104,152		37,16
Dieta básica + naringenina	-27,64	-1,26		-36,39
Dieta modificada + naringenina	38,45	30,32		16,61
	Albumina			
Dieta modificada	5,52	-4,31		-1,21
Dieta básica + naringenina	6,61	-4,75		-1,41
Dieta modificada + naringenina	3,21	-1,81		-1,14

¹ Dias após o início da administração do flavonóide.

Quadro 17 – Concentração dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹), peso (g) e consumo alimentar total (g) dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 1)

Variável	Dias após início aplicação flavonóide	Dieta					
		Básica			Modificada		
		Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina
Creatinina	-3	0,82 ± 0,49 ² a ³	1,04 ± 0,40 a	0,75 ± 0,12 a	0,71 ± 0,21 a	0,90 ± 0,42 a	1,06 ± 0,25 a
	29	0,74 ± 0,21 a	0,80 ± 0,25 a	0,72 ± 0,17 a	0,69 ± 0,13 a	0,85 ± 0,50 a	0,84 ± 0,16 b
Colesterol	-3	101,8 ± 20,8 a	118,8 ± 25,7 a	110,0 ± 21,5 a	108,1 ± 13,4 a	115,9 ± 43,5 a	131,3 ± 19,3 a
	29	139,2 ± 24,4 b	135,3 ± 16,2 a	129,7 ± 11,6 a	138,1 ± 34,7 b	130,3 ± 35,0 a	141,8 ± 16,2 a
Triacilgliceróis	-3	98,9 ± 25,1 a	112,4 ± 42,4 a	132,9 ± 35,6 a	114,7 ± 40,0 a	108,2 ± 62,5 a	158,5 ± 50,9 a
	29	134,1 ± 47,4 a	152,9 ± 39,8 a	134,7 ± 49,5 a	158,8 ± 40,5 b	180,4 ± 130,5 a	155,8 ± 53,6 a
Glicose	-1	121,7 ± 14,5 a	153,2 ± 34,2 a	138,4 ± 18,1 a	147,5 ± 20,4 a	197,4 ± 168,6 a	184,0 ± 100,9 a
	29	151,1 ± 103,3 a	195,9 ± 213,4 a	124,6 ± 27,0 a	129,7 ± 20,4 a	268,7 ± 371,1 a	228,5 ± 223,5 a
Albumina (g.dL ⁻¹)	-3	4,78 ± 0,23 a	4,68 ± 0,32 a	4,62 ± 0,08 a	4,85 ± 0,15 a	4,78 ± 0,32 a	4,73 ± 0,34 a
	29	4,37 ± 0,18 b	4,25 ± 0,40 b	4,19 ± 0,10 b	4,60 ± 0,17 b	4,20 ± 0,42 b	4,20 ± 0,11 b
Peso (g)	-1	291,2 ± 39,3 a	256,0 ± 60,1 a	294,8 ± 29,8 a	295,4 ± 32,6 a	282,1 ± 87,3 a	279,5 ± 43,6 a
	29	355,0 ± 60,5 b	338,8 ± 94,8 b	364,6 ± 38,6 a	369,3 ± 23,7 b	320,8 ± 104,6 b	344,5 ± 68,8 b
Consumo alimentar total (g)	-1 a 28	492,7 ± 82,1	574,3 ± 146,5	499,6 ± 42,4	443,9 ± 180,5	639,0 ± 345,8	615,8 ± 150,0
Nº de ratos		5	5	5	5	8	6

¹ Ratos que não receberam aloxano.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, pelo teste t (P > 0,05).

Quadro 18 – Resumo das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos de ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 1)[†]

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Dieta (D)	1	2610,422	0,227	0,639
	Flavonóide (F)	1	15595,02	1,359	0,258
	D x F	1	2666,005	0,232	0,635
	Erro a	20	11479,45		
	Época (E)	1,71 *	7814,92	47,644	5,4 x 10 ⁻¹⁰
	E x D	1,71 *	228,800	1,395	0,260
	E x F	1,71 *	9,148	0,056	0,924
	E x D x F	1,71 *	270,192	1,647	0,210
	Erro b	34,3 *	164,027		
	C.V. a (%)			33,41	
C.V. b (%)			3,99		
Creatinina	Dieta (D)	1	0,075	1,000	0,331
	Flavonóide (F)	1	0,023	0,314	0,582
	D x F	1	0,009	0,123	0,730
	Erro a	18	0,075		
	Época (E)	2	0,098	4,658	0,016
	E x D	2	0,003	0,135	0,874
	E x F	2	0,010	0,474	0,626
	E x D x F	2	0,005	0,258	0,774
	Erro b	36	0,021		
	C.V. a (%)			37,84	
C.V. b (%)			20,02		
Colesterol	Dieta (D)	1	422,041	0,847	0,369
	Flavonóide (F)	1	46,553	0,093	0,763
	D x F	1	455,121	0,914	0,351
	Erro a	19	498,161		
	Época (E)	1,88 *	3718,095	12,583	9,67 x 10 ⁻⁵
	E x D	1,88 *	15,728	0,053	0,940
	E x F	1,88 *	23,905	0,081	0,913
	E x D x F	1,88 *	542,109	1,834	0,176
	Erro b	35,8 *	295,496		
	C.V. a (%)			16,97	
C.V. b (%)			13,07		
Triacilgliceróis	Dieta (D)	1	2869,789	0,781	0,388
	Flavonóide (F)	1	2545,335	0,693	0,415
	D x F	1	55,582	0,015	0,903
	Erro a	19	3671,343		
	Época (E)	1,92 *	2636,903	1,076	0,349
	E x D	1,92 *	1320,66	0,539	0,581
	E x F	1,92 *	291,058	0,119	0,881
	E x D x F	1,92 *	48,940	0,020	0,977
	Erro b	36,5 *	2448,871		
	C.V. a (%)			40,94	
C.V. b (%)			33,44		

[†] O experimento foi considerado como delineamento em parcelas subdivididas tendo as épocas de avaliação (dias após o início da aplicação do flavonóide: 6, 12, 19 e 26 dias para o peso e 6, 12 e 26 dias para os constituintes sanguíneos) como subparcelas.

* Os graus de liberdade foram ajustados devido a matriz de covariância residual não preencher a condição H – F (pressuposição de especificidade) (HUYNH & FELDT, 1970).

Quadro 18 – Continuação

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Glicose	Dieta (D)	1	129361,5	1,887	0,186
	Flavonóide (F)	1	20445,18	0,298	0,591
	D x F	1	376,205	0,005	0,941
	Erro a	19	68565,35		
	Época (E)	2	6489,118	1,369	0,267
	E x D	2	552,448	0,117	0,890
	E x F	2	2207,179	0,466	0,631
	E x D x F	2	10013,53	2,112	0,135
	Erro b	38	4741,331		
	C.V. a (%)			133,87	
C.V. b (%)			35,20		
Albumina	Dieta (D)	1	$6,35 \times 10^{-5}$	0,0006	0,981
	Flavonóide (F)	1	0,0002	0,002	0,969
	D x F	1	0,0007	0,006	0,937
	Erro a	19	0,114		
	Época (E)	1,67 *	0,718	8,804	0,002
	E x D	1,67 *	0,009	0,111	0,860
	E x F	1,67 *	0,031	0,382	0,647
	E x D x F	1,67 *	0,174	2,133	0,142
	Erro b	31,6 *	0,082		
	C.V. a (%)			7,77	
C.V. b (%)			6,59		

Quadro 19 – Resumo das análises de covariâncias¹ do peso e constituintes sangüíneos dos ratos diabéticos em função dos tratamentos, ao final² do experimento 1

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Regressão ³	1	55648,6	51,636	7,94 x 10 ⁻⁷
	Dieta	1	3747,063	3,477	0,078
	Tratamentos ⁴	1	59,124	0,055	0,817
	Dieta x Tratamento	1	3029,344	2,811	0,110
	Resíduo	19	1077,705		
	C.V. (%)			9,67	
Triacilgliceróis	Regressão ³	1	698,056	0,203	0,658
	Dieta	1	3796,97	1,102	0,307
	Tratamentos ⁴	1	1176,92	0,342	0,566
	Dieta x Tratamento	1	4,1819	0,001214	0,972569
	Resíduo	19	3444,791		
	C.V. (%)			36,91	
Creatinina	Regressão ³	1	0,088	3,707	0,070
	Dieta	1	0,001	0,038	0,848
	Tratamentos ⁴	1	0,002	0,100	0,755
	Dieta x Tratamento	1	0,001	0,036	0,852
	Resíduo	18	0,024		
	C.V. (%)			19,78	

¹ Foi considerada como covariável, a respectiva variável determinada no início do experimento: o peso 1 dia antes e os constituintes sangüíneos, 3 dias antes do início da administração da naringenina.

² Determinadas 27 dias após o início da aplicação do flavonóide.

³ Correspondente à covariável.

⁴ Naringenina e testemunha diabética.

Quadro 20 - Correlação momento-produto de Pearson¹ entre peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos de ratos no início do experimento 1²

	Consumo ³	Creatinina	Colesterol	Triacilgliceróis	Glicose	Albumina
Consumo	----	0,39	0,32	0,73 *	0,04	0,30
Creatinina	-0,26	----	-0,17	0,14	-0,23	0,16
Colesterol	-0,00	-0,41	----	0,53	0,20	0,66 *
Triacilgliceróis	-0,08	0,56	0,08	----	0,48	0,22
Glicose	-0,60 *	0,69 *	-0,02	0,52	----	0,08
Albumina	-0,03	-0,61 *	0,43	-0,18	-0,28	----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 10 ratos testemunhas normais e a diagonal inferior, em 13 ratos testemunhas diabéticos.

² Determinações 9 dias após aplicação do aloxano.

³ De 0 a 6 dias após aplicação do aloxano.

Quadro 21 – Algumas correlações momento-produto de Pearson entre peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos normais e diabéticos, ao final do experimento 1¹, segundo a dieta consumida e o tratamento

	Testemunha normal			Testemunha diabética			Naringenina	
	DB ² (5) ³	DM ² (4)	DB e DM ⁴ (9)	DB (5)	DM (8)	DB e DM (13)	DB (5)	DM (6)
Glicose e albumina	0,05	0,14	0,57	-0,62	-0,62	-0,61 *	0,80	0,82 *
Glicose e colesterol	0,85	0,31	0,63	-0,67	-0,09	-0,24	0,31	0,88 *
Glicose, consumo	-0,91 *	-0,13	-0,89 **	0,96 **	0,72	0,75 **	0,84	0,96 **
Glicose e peso	-0,82	-0,15	-0,80 **	-0,95 *	-0,90 **	-0,90 **	0,71	-0,82 *
Glicose e creatinina	0,86	-0,57	0,77 *	-0,13	0,60	0,44	0,33	0,61
Consumo e peso	0,93 *	0,95 *	0,92 **	-0,86	-0,77 *	-0,73 **	0,69	-0,77
Consumo creatinina	-0,80	-0,18	-0,74 *	-0,17	-0,02	-0,03	-0,06	0,52
Albumina e peso	0,37	0,32	0,39	0,34	0,78 *	0,58 *	-0,38	-0,98 **
Colesterol e Triacilgl.	0,95 *	0,45	0,68	0,10	0,89 **	0,73 **	0,91 *	0,62
Triacilgl. e creatinina	0,71	0,58	0,55	-0,88 *	0,57	0,37	-0,17	-0,01

* ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ 39 dias após aplicação do aloxano.

² DB e DM: ratos que se alimentaram de dieta básica e modificada, respectivamente.

³ Número de ratos.

⁴ O coeficiente de correlação foi estimado considerando conjuntamente os ratos que se alimentaram de uma ou outra dieta.

3.2. Experimento 2

Nos ratos que receberam aloxano, em avaliação feita 6 dias após, não foram constatadas diferenças no efeito das 2 dietas sobre os constituintes sanguíneos, peso e consumo alimentar (Figura 10). Os valores de creatinina foram $0,58 \pm 0,07 \text{ mg.dL}^{-1}$ e $0,63 \pm 0,05 \text{ mg.dL}^{-1}$ (média \pm I.C.(μ)_{0,95}) para a dieta básica e modificada, respectivamente. Desses 70 ratos que receberam aloxano, 6 dias após, 28,6% haviam morrido, antes da primeira determinação da glicemia; e dos 50 ratos sobreviventes, 28 apresentaram-se diabéticos (glicemia > 120 mg.dL^{-1}) (Quadro 22). Nesses 28 ratos foi estudado o efeito de dietas e da naringenina.

A administração de naringenina diminuiu o número de ratos diabéticos apenas do grupo que se alimentava de dieta básica. No entanto, 60% dos 10 ratos testemunhas normais, apresentaram-se inicialmente hiperglicêmicos, sendo que essa percentagem foi reduzida à metade, no final do experimento (Quadro 22).

A média dos constituintes sanguíneos, peso e consumo alimentar, no decorrer do experimento, é apresentada nas Figuras 11 e 12, para cada tratamento.

A variação percentual em relação a testemunha diabética que consumiu dieta básica é apresentada no Quadro 23.

Nos ratos em que não foi aplicado aloxano (testemunha normal) não houve efeito de dietas no peso e nos constituintes sanguíneos, à exceção de albumina, com relação a qual houve diferença significativa no início, mas não no final do experimento (Quadro 24). Isto é devido à diminuição do nível de albumina, pelo uso da dieta modificada entre o início e final do experimento. Ambas dietas proporcionaram ganho de peso das testemunhas normais (Quadro 25).

Em ratos diabéticos, entre o início e o final do experimento, a glicemia não apresentou variação. Dentre os que consumiram dieta básica, houve aumento somente de peso, nos ratos tratados com naringenina; nos diabéticos, o consumo de dieta modificada proporcionou aumento do nível de colesterol, independente do tratamento e diminuição do nível de albumina apenas nos ratos que receberam naringenina (Quadro 25).

Foi feita análise de variância de medidas repetidas entre os tratamentos e dietas aplicados aos ratos diabéticos quanto ao peso e constituintes sanguíneos. O experimento foi considerado como delineamento em parcelas subdivididas, tendo as épocas de avaliação como subparcelas (Quadro 26).

Para as características peso, glicemia e nível de triacilgliceróis, que apresentaram alto coeficiente de variação, procedeu-se a análise de covariância dessas características ao final do experimento, considerando como covariável seu valor no início do experimento, com o objetivo de reduzir o erro experimental. Foi verificada diferença significativa do efeito de flavonóide no peso (Quadro 27). Os ratos diabéticos que consumiram naringenina apresentaram maior peso ao final do experimento. Não foi possível realizar análise de covariância do nível de triacilgliceróis devido a não homogeneidade dos coeficientes de regressão (de todos os tratamentos) da variável em relação à covariável.

Após a última avaliação, 27 dias após o início da administração do flavonóide, trocaram-se as dietas de 12 ratos testemunhas diabéticos. Quatorze dias após, os ratos que passaram a receber dieta básica apresentaram redução dos níveis de triacilgliceróis e albumina, bem como do consumo alimentar. Já os ratos que passaram a receber dieta modificada apresentaram somente aumento do peso final em relação ao peso por ocasião da mudança da dieta (Quadro 28).

Quadro 22 – Número de ratos mortos e diabéticos (experimento 2)

Aloxano	Dieta	Número de Ratos						
		Total	Mortos ¹	Tratamento ²	Glicemia > 120 mg.dL ⁻¹			
					Dias após o início do tratamento			
					-1	7	14	27
Não	Básica	5	0	TN	3	4	3	1
	Modificada	5	0	TN	3	5	3	2
Sim	Básica	35	11	TD	6	6	5	5
				Naringenina	6	5	3	3
	Modificada	35	9	TD	8	6 ³	6 ⁴	7
				Naringenina	8	8	5	8

¹ Na primeira semana após a aplicação do aloxano, antes da determinação da glicemia inicial.

² TN, TD: testemunhas normais e diabéticas, respectivamente.

³ Não foi feita determinação em 1 dos ratos.

⁴ Um rato diabético morreu antes da terceira avaliação.

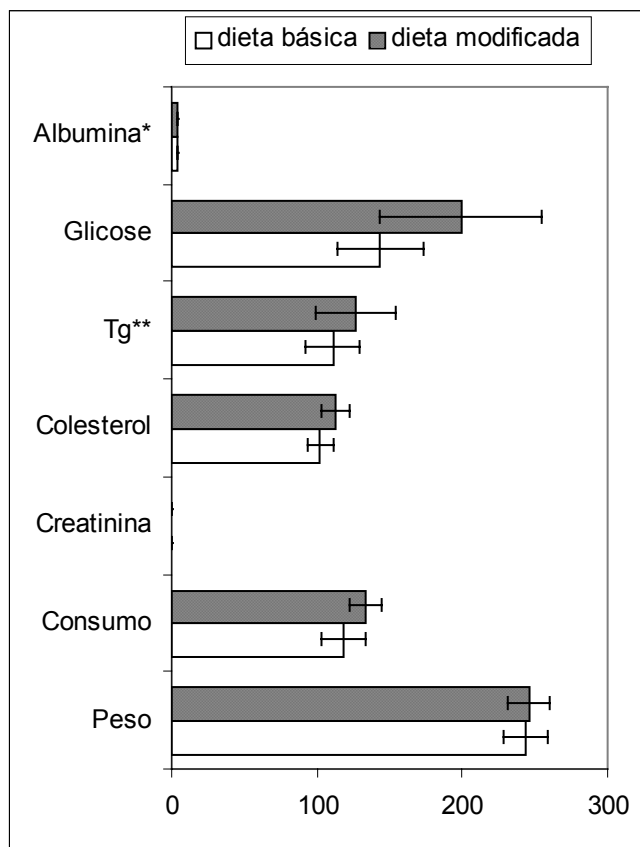


Figura 10 – Efeito das dietas no peso (g), consumo alimentar (g) e constituintes sangüíneos (mg.dL^{-1} de sangue) de ratos sobreviventes, 6 dias após aplicação de aloxano. A barra representa o $\text{I.C.}(\mu)_{0,95}$. 24 ratos receberam dieta básica e 26, dieta modificada. Não houve diferenças entre as médias das duas dietas pelo teste t ($P > 0,07$) (experimento 2). (* g.dL^{-1} , ** Triacilgliceróis)

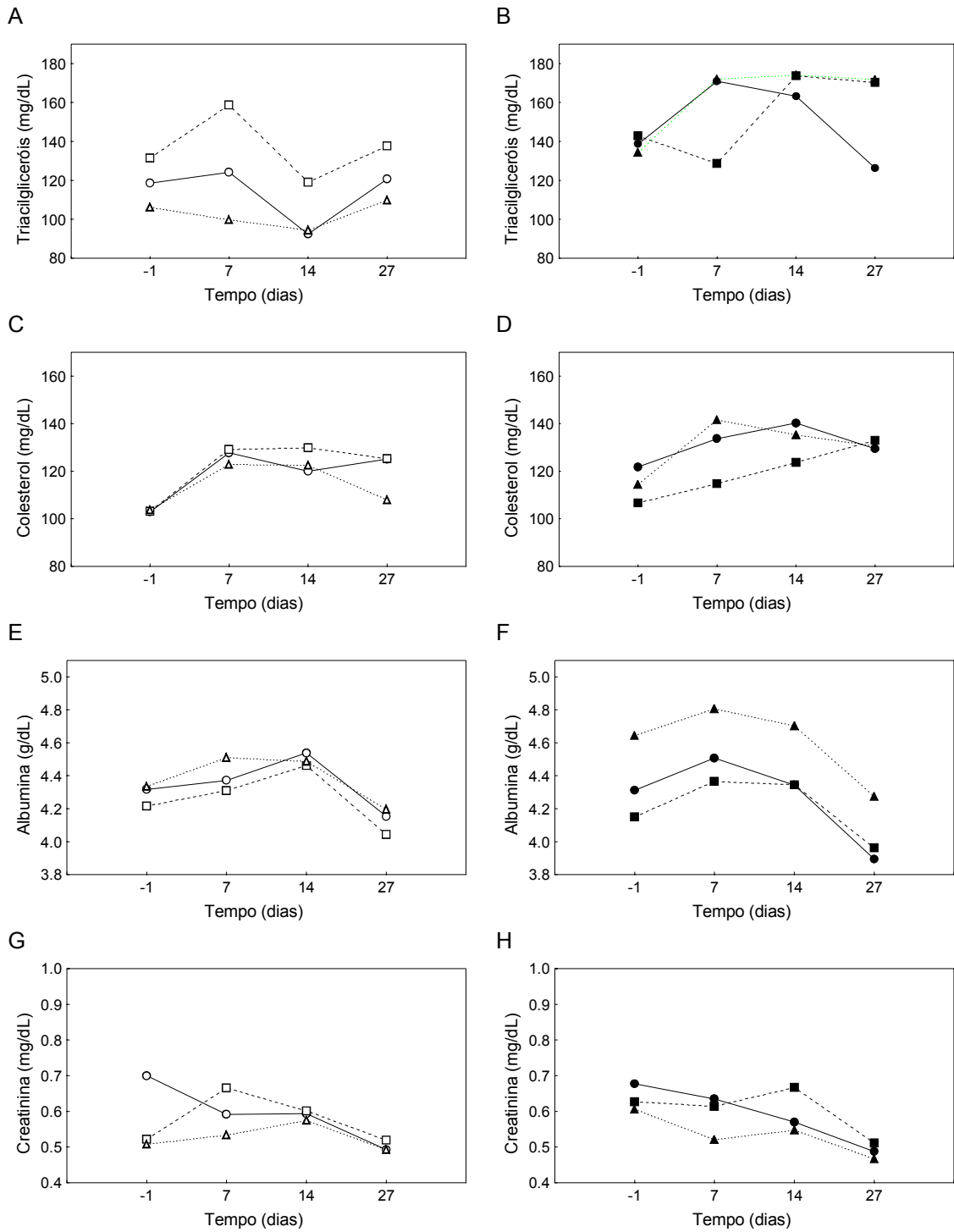


Figura 11 - Médias dos níveis sanguíneos de triacylgliceróis (A e B), colesterol (C e D), albumina (E e F) e creatinina (G e H), em ratos alimentando-se de dieta básica (símbolo vazio) ou modificada (símbolo cheio), no experimento 2. O dia zero corresponde ao início da administração do flavonóide (O - naringenina; - testemunha diabética e Δ - testemunha normal).

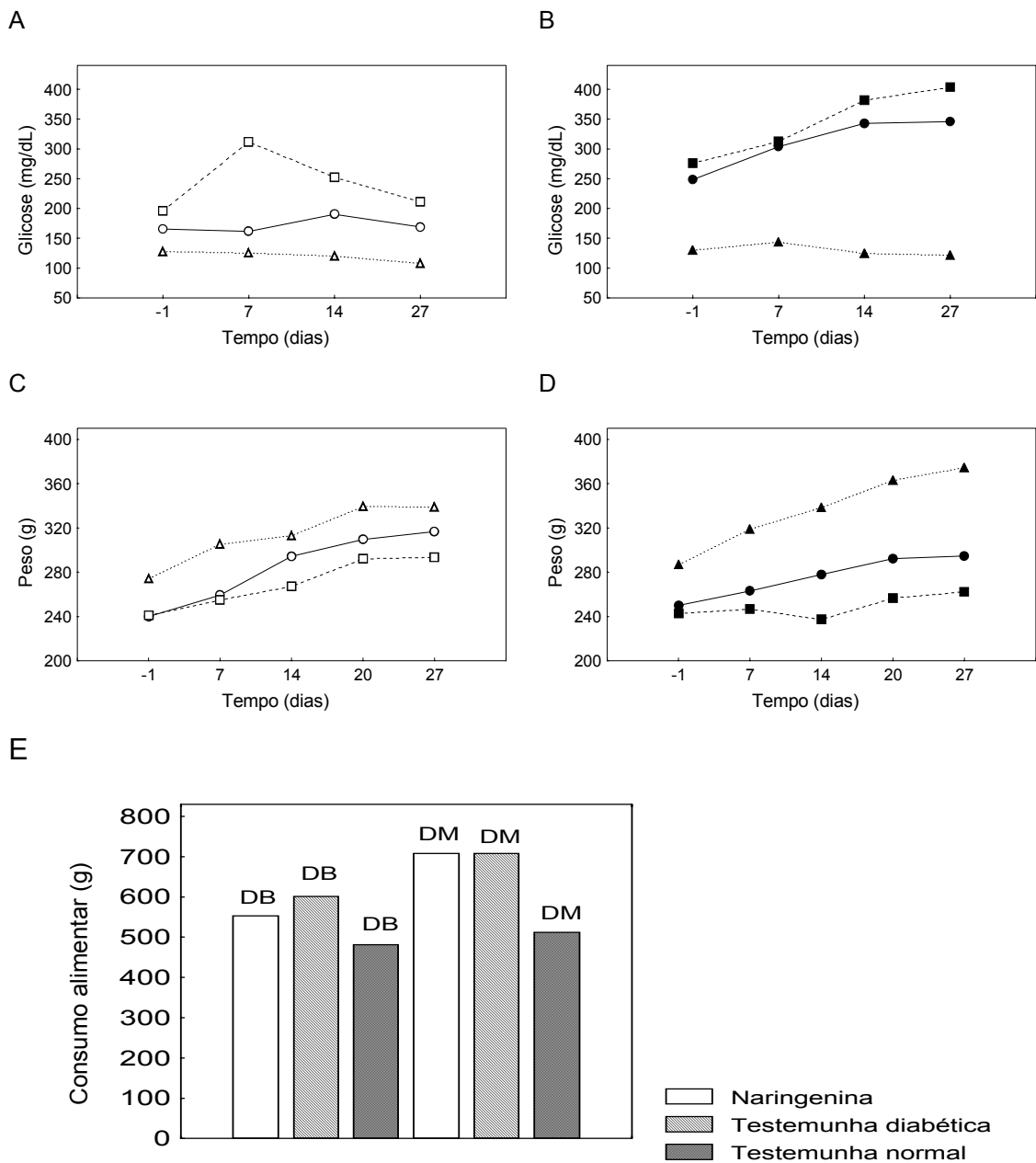


Figura 12 - Médias dos níveis sangüíneos de glicose (A e B), peso (C e D) (O - naringenina; □ - testemunha diabética e Δ - testemunha normal) e consumo alimentar (E) em ratos alimentando-se de dieta básica (DB, símbolo vazio) ou modificada (DM, símbolo cheio), no experimento 2. O dia zero corresponde ao início da administração do flavonóide.

Quadro 23 – Variação média (%) do peso e constituintes sangüíneos de ratos, em relação a testemunha diabética que recebeu dieta básica (experimento 2)

Tratamentos	Tempo (dias) ¹			
	8	15	22	29
	Peso			
Dieta modificada	-3,31	-11,18	-12,23	-10,58
Dieta básica + naringenina	1,70	10,17	5,99	8,02
Dieta modificada + naringenina	3,19	4,01	0,03	0,50
	Creatinina			
Dieta modificada	-7.63	10.88		-1.45
Dieta básica + naringenina	-11.03	-1.39		-5.08
Dieta modificada + naringenina	-4.51	-5.26		-6.14
	Colesterol			
Dieta modificada	-11,18	-4,70		6,17
Dieta básica + naringenina	-1,16	-7,49		-0,15
Dieta modificada + naringenina	3,43	8,08		19,49
	Triacilgliceróis			
Dieta modificada	-18,95	45,90		23,77
Dieta básica + naringenina	-21,77	-22,32		-12,34
Dieta modificada + naringenina	7,69	37,20		23,43
	Glicose			
Dieta modificada	0,44	51,39		91,42
Dieta básica + naringenina	-48,06	-24,48		-19,86
Dieta modificada + naringenina	-2,35	35,91		63,98
	Albumina			
Dieta modificada	1,33	-2,63		-1,98
Dieta básica + naringenina	1,47	1,72		2,72
Dieta modificada + naringenina	4,61	-2,64		-3,70

¹ Dias após o início da administração do flavonóide.

Quadro 24 – Efeito das dietas no peso (g), consumo alimentar (g) e constituintes sangüíneos (mg.dL⁻¹) de ratos que não receberam aloxano (testemunha normal) (experimento 2)

	Dias após início dieta	Dieta		T (teste t)	Probabilidade
		Básica	Modificada		
Peso	2	257,8	264,4	-0,360	0,728
	37	338,6	374,6	-1,625	0,143
Consumo alimentar	2 a 37	617,2	659,2	-1,554	0,159
Creatinina	9	0,51	0,61	-1,313	0,226
	37	0,49	0,47	0,761	0,472
Colesterol	9	103,6	114,3	-1,383	0,204
	37	107,9	130,6	-1,307	0,228
Triacilgliceróis	9	106,2	134,3	-1,191	0,268
	37	109,7	171,9	-1,726	0,123
Glicose	9	127,2	129,5	-0,161	0,876
	37	107,9	121,4	-1,223	0,256
Albumina (g.dL ⁻¹)	9	4,33	4,64	-3,406	0,009
	37	4,20	4,27	-0,719	0,493

Quadro 25 – Concentração dos constituintes sangüíneos (mg.dL⁻¹), peso (g) e consumo alimentar total (g) dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 2)

	Dias após início do flavonóide	Dieta básica			Dieta modificada		
		Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Testemunha normal ¹	Diabéticos Testemunha	Diabéticos + naringenina
Creatinina	-1	0,51 ± 0,12 ² a ³	0,52 ± 0,06 a	0,70 ± 0,25 a	0,61 ± 0,17 a	0,63 ± 0,10 a	0,68 ± 0,08 a
	27	0,49 ± 0,06 a	0,52 ± 0,07 a	0,49 ± 0,11 a	0,47 ± 0,08 a	0,51 ± 0,10 a	0,49 ± 0,06 b
Colesterol	-1	103,6 ± 14,8 a	103,3 ± 21,3 a	103,0 ± 23,1 a	114,3 ± 15,5 a	106,6 ± 21,2 a	121,8 ± 22,2 a
	27	107,9 ± 43,2 a	125,3 ± 25,9 a	125,1 ± 16,6 a	130,6 ± 21,5 a	133,1 ± 20,6 b	129,5 ± 10,8 b
Triacilgliceróis	-1	106,2 ± 27,1 a	131,4 ± 45,6 a	118,6 ± 60,0 a	134,3 ± 59,0 a	142,9 ± 38,8 a	138,7 ± 92,9 a
	27	109,7 ± 57,3 a	137,6 ± 50,6 a	120,7 ± 25,2 a	171,9 ± 81,9 a	170,4 ± 54,6 a	126,4 ± 24,7 a
Glicose	-1	127,2 ± 33,7 a	195,7 ± 120,5 a	165,5 ± 38,9 a	129,5 ± 21,0 a	276,2 ± 157,8 a	248,3 ± 117,3 a
	27	107,9 ± 18,9 a	210,9 ± 164,4 a	169,0 ± 147,5 a	121,4 ± 24,1 a	403,7 ± 227,3 a	345,8 ± 190,4 a
Albumina (g.dL ⁻¹)	-1	4,33 ± 0,21 a	4,22 ± 0,20 a	4,32 ± 0,26 a	4,64 ± 0,14 a	4,15 ± 0,34 a	4,31 ± 0,32 a
	27	4,20 ± 0,30 a	4,04 ± 0,31 a	4,15 ± 0,11 a	4,27 ± 0,15 b	3,96 ± 0,38 a	3,89 ± 0,30 b
Peso (g)	-1	274,0 ± 35,1 a	241,0 ± 40,5 a	239,8 ± 43,7 a	286,8 ± 24,7 a	242,4 ± 37,9 a	249,9 ± 32,4 a
Consumo alimentar total (g)	-1 a 26	481,3 ± 45,6	601,6 ± 137,2	553,1 ± 130,0	512,2 ± 45,0	708,1 ± 214,85	708,0 ± 120,3
N ^o de ratos		5	6	6	5	7	8

¹ Ratos que não receberam aloxano.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sangüíneo, pelo teste t (P > 0,05).

Quadro 26 – Resumo das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 2)¹

Variável	Fonte variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Dieta (D)	1	16293,83	0,900	0,353
	Flavonóide (F)	1	10275,74	0,567	0,459
	D x F	1	1165,739	0,064	0,802
	Erro a	23	18113,13		
	Época (E)	2,18 *	7332,19	24,393	1,83 x 10 ⁻⁸
	E x D	2,18 *	670,120	2,229	0,114
	E x F	2,18 *	905,162	3,011	0,054
	E x D x F	2,18 *	24,963	0,083	0,933
	Erro b	50,0 *	300,589		
	C.V. a (%)			48,83	
	C.V. b (%)			6,29	
Creatinina	Dieta (D)	1	0,024	1,427	0,244
	Flavonóide (F)	1	0,0003	0,015	0,902
	D x F	1	2,94 x 10 ⁻⁵	0,002	0,967
	Erro a	23	0,017		
	Época (E)	1,73 *	0,119	8,357	0,002
	E x D	1,73 *	0,002	0,113	0,866
	E x F	1,73 *	0,002	0,108	0,871
	E x D x F	1,73 *	0,014	0,980	0,373
	Erro b	39,7 *	0,014		
	C.V. a (%)			22,53	
	C.V. b (%)			20,45	
Colesterol	Dieta (D)	1	164,859	0,265	0,612
	Flavonóide (F)	1	211,526	0,340	0,566
	D x F	1	856,009	1,377	0,254
	Erro a	21	621,668		
	Época (E)	2	57,332	0,182	0,834
	E x D	2	157,096	0,498	0,611
	E x F	2	298,508	0,946	0,396
	E x D x F	2	346,157	1,097	0,343
	Erro b	42	315,431		
	C.V. a (%)			19,49	
	C.V. b (%)			13,88	
Triacilgliceróis	Dieta (D)	1	4184,459	1,218	0,282
	Flavonóide (F)	1	12371,83	3,600	0,072
	D x F	1	2283,833	0,665	0,424
	Erro a	21	3435,817		
	Época (E)	2	463,455	0,239	0,788
	E x D	2	1387,021	0,716	0,495
	E x F	2	4765,898	2,460	0,098
	E x D x F	2	3502,326	1,808	0,177
	Erro b	42	1937,539		
	C.V. a (%)			41,30	
	C.V. b (%)			31,01	

¹ O experimento foi considerado como delineamento em parcelas subdivididas tendo as épocas de avaliação (dias após o início da aplicação do flavonóide: 7, 14, 20 e 27 dias para o peso e 7, 14 e 27 dias para os constituintes sanguíneos) como subparcelas.

* Os graus de liberdade foram ajustados devido a matriz de covariância residual não preencher a condição H – F (pressuposição de especificidade) (HUYNH & FELDT, 1970).

Quadro 26 – Continuação

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Glicose	Dieta (D)	1	42707,84	0,329	0,572
	Flavonóide (F)	1	275933,1	2,125	0,159
	D x F	1	26622,33	0,205	0,655
	Erro a	22	129878,3		
	Época (E)	1,72 *	945,422	0,214	0,776
	E x D	1,72 *	4923,202	1,115	0,331
	E x F	1,72 *	13850,26	3,136	0,062
	E x D x F	1,72 *	5754,524	1,302	0,280
	Erro b	37,9 *	4416,892		
	C.V. a (%)			124,88	
C.V. b (%)			23,03		
Albumina	Dieta (D)	1	0,125	0,687	0,417
	Flavonóide (F)	1	0,022	0,121	0,731
	D x F	1	4,47 x 10 ⁻⁵	0,0002	0,988
	Erro a	21	0,182		
	Época (E)	2	1,265	30,343	7,02 x 10 ⁻⁹
	E x D	2	0,006	0,150	0,861
	E x F	2	0,067	1,600	0,214
	E x D x F	2	0,015	0,349	0,708
	Erro b	42	0,042		
	C.V. a (%)			9,99	
C.V. b (%)			4,80		

Quadro 27 – Resumo das análises de covariâncias¹ do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função dos tratamentos, ao final² do experimento 2

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Regressão ³	1	106837,2	54,763	2,1 x 10 ⁻⁷
	Dieta	1	3402,101	1,744	0,200
	Tratamentos ⁴	1	8724,775	4,472	0,046
	Dieta x Tratamento	1	54,172	0,028	0,869
	Resíduo	22	1950,894		
C.V. (%)			15,19		
Glicose	Regressão ³	1	584781,7	35,551	5,32 x 10 ⁻⁶
	Dieta	1	1307,837	0,080	0,781
	Tratamentos ⁴	1	42274,93	2,570	0,123
	Dieta x Tratamento	1	594,546	0,036	0,851
	Resíduo	22	16449,17		
C.V. (%)			43,99		

¹ Foi considerada como covariável, a respectiva variável determinada no início do experimento: o peso 1 dia após e 1 dia antes do início da aplicação dos flavonóides.

² Determinadas 27 dias após o início da aplicação dos flavonóides.

³ Correspondente a covariável.

⁴ Fruta-de-lobo, naringenina e testemunha diabética.

Quadro 28 – Efeito da alteração da dieta no peso (g), consumo alimentar (g) e constituintes sangüíneos (mg.dL⁻¹) em ratos diabéticos que não receberam naringenina (experimento 2)

Características	Dias após mudança da dieta	Alteração da dieta ¹	
		De básica para modificada	De modificada para básica
Peso	0	274,2 ± 102,5 ² a ³	262,2 ± 77,1 a
	7	302,6 ± 103,7	278,7 ± 88,4
	14	296,4 ± 109,0 b	271,9 ± 94,1 a
Consumo alimentar	-7 a 0	137,9 ± 46,9 a	198,0 ± 62,7 a
	0 a 7	174,5 ± 76,2	180,9 ± 42,7
	8 a 14	145,0 ± 74,5 a	149,9 ± 48,9 b
Creatinina	0	0,50 ± 0,07 a	0,51 ± 0,10 a
	14	0,45 ± 0,23 a	0,54 ± 0,11 a
Colesterol	0	118,9 ± 26,6 a	133,1 ± 20,6 a
	14	126,0 ± 19,5 a	124,4 ± 25,0 a
Triacilgliceróis	0	122,5 ± 42,9 a	170,4 ± 54,6 a
	14	130,8 ± 31,2 a	118,7 ± 38,4 b
Glicose	0	229,0 ± 208,5 a	403,7 ± 227,3 a
	14	268,5 ± 244,5 a	381,7 ± 212,1 a
Albumina (g.dL ⁻¹)	0	3,99 ± 0,36 a	3,96 ± 0,38 a
	14	3,91 ± 0,20 a	3,59 ± 0,48 b
N ^o ratos		5	7

¹ Os ratos se alimentaram com a primeira dieta por 37 dias.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada característica, pelo teste t (P > 0,05).

3.3. Experimento 3

Foi avaliado, durante 4 semanas, o efeito do flavonóide naringenina e de 2 dietas nos constituintes sangüíneos, peso e consumo alimentar de ratos, nos quais foi previamente induzida hiperglicemia por meio de aplicação de aloxano.

Nos ratos que receberam aloxano, em avaliação feita 6 dias após, não foram constatadas diferenças, pelo teste t, no efeito das duas dietas sobre o peso (P > 0,35). Porém, houve diferença na glicemia (P < 0,011). Os ratos que receberam dieta modificada apresentaram maior glicemia (273,69 ± 93,26 mg.dL⁻¹ (média ± I.C.(μ)_{0,95})) que aqueles que receberam dieta básica (139,26 ± 39,06 mg.dL⁻¹).

Dos 50 ratos que receberam aloxano, 6 dias após, cerca de 20% haviam morrido, antes da primeira determinação da glicemia; e dos 39 ratos sobreviventes, 26 apresentaram-se diabéticos (glicemia > 115 mg.dL⁻¹). Nesses 26 ratos foi estudado o efeito de dietas e da naringenina. Tanto a naringenina quanto as dietas não afetaram o número de ratos diabéticos ao final do experimento (Quadro 29).

As médias dos constituintes sangüíneos, peso e consumo alimentar, ao longo do experimento, são apresentadas na Figura 13. A variação percentual em relação à testemunha diabética que consumiu dieta básica é apresentada no Quadro 30.

Em ratos diabéticos, entre o início e o final do experimento, a glicemia não apresentou variação. Houve diminuição do nível de albumina em todos os tratamentos, diminuição do nível de creatinina em ratos que consumiram dieta modificada, diminuição do

colesterol apenas em ratos testemunhas que consumiram dieta modificada e aumento de peso apenas naqueles que se alimentaram de dieta básica e consumiram naringenina (Quadro 31).

Foi feita análise de variância de medidas repetidas dos efeitos de dieta e flavonóide no peso e constituintes sangüíneos de ratos diabéticos. O experimento foi considerado como delineamento em parcelas subdivididas, tendo as épocas de avaliação como subparcelas (Quadro 32). Para as características peso, glicemia e nível de triacilgliceróis, que apresentaram alto coeficiente de variação, procedeu-se a análise de covariância dessas características ao final do experimento, considerando como covariável seu valor no início do experimento, com o objetivo de reduzir o erro experimental (Quadro 33).

Embora os tratamentos aplicados aos ratos diabéticos apresentem diferenças com relação às médias de algumas características (Figura 13), a maioria dessas diferenças não foi estatisticamente significativa devido à alta variabilidade das características avaliadas, apresentada pelos ratos que compunham um mesmo tratamento evidenciadas pelo intervalo de confiança da média (Quadro 31).

Após a última avaliação, 26 dias após o início da administração do flavonóide, 12 ratos testemunhas diabéticos passaram a receber dieta trocada. Quatorze dias após, os ratos que passaram a receber dieta básica apresentaram redução do nível de triacilgliceróis. Já os ratos que passaram a receber dieta modificada apresentaram aumento do peso final em relação ao peso por ocasião da mudança da dieta e aumento do consumo alimentar (Quadro 34).

Quadro 29 – Número de ratos mortos e diabéticos, após a aplicação do aloxano no experimento 3

Dieta	Número de ratos				
	Total	Mortos ¹	Tratamento	Glicemia > 115 mg.dL ⁻¹	
				Dias após início do tratamento	
				0	26
Básica	25	5	Testemunha	5	5
			Naringenina	5	4
Modificada	25	6	Testemunha	8	8
			Naringenina	8	8

¹ Na primeira semana após aplicação do aloxano, antes da determinação da glicemia.

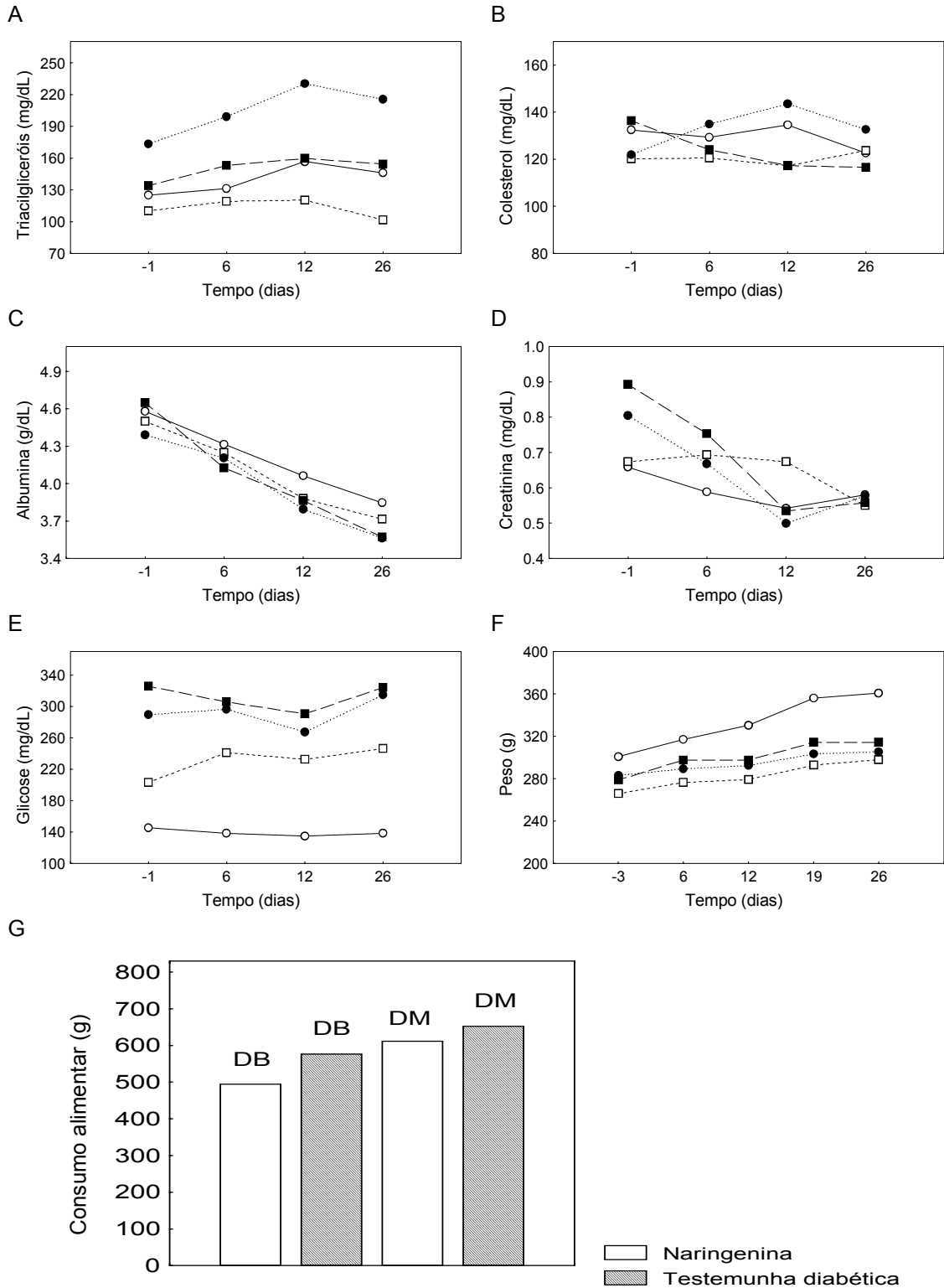


Figura 13 - Médias dos níveis sanguíneos de triacilgliceróis (A), colesterol (B), albumina (C), creatinina (D), glicose (E) e peso (F) (O - naringenina e - testemunha diabética) e consumo alimentar (G) em ratos alimentando-se de dieta básica (DB, símbolo vazio) ou modificada (DM, símbolo cheio), no experimento 3. O dia zero corresponde ao início da administração do flavonóide.

Quadro 30 – Variação média (%) do peso e constituintes sangüíneos de ratos, em relação à testemunha diabética que recebeu dieta básica (experimento 3)

Tratamentos	Tempo (dias) ¹			
	8	15	22	29
Peso				
Dieta modificada	7,59	6,63	7,30	5,45
Dieta básica + naringenina	14,69	8,42	21,50	21,07
Dieta modificada + naringenina	4,69	4,84	3,50	2,47
Creatinina				
Dieta modificada	8,61	-20,74		1,36
Dieta básica + naringenina	-15,27	-19,58		5,45
Dieta modificada + naringenina	-3,82	-25,91		4,77
Colesterol				
Dieta modificada	2,97	0,24		-5,80
Dieta básica + naringenina	7,27	14,81		-0,97
Dieta modificada + naringenina	11,93	22,46		7,17
Triacilgliceróis				
Dieta modificada	28,31	33,04		51,72
Dieta básica + naringenina	10,10	30,43		43,41
Dieta modificada + naringenina	66,99	91,59		111,51
Glicose				
Dieta modificada	26,87	24,87		31,65
Dieta básica + naringenina	-42,57	-42,10		-43,83
Dieta modificada + naringenina	23,03	14,91		27,79
Albumina				
Dieta modificada	-2,84	-0,37		-3,84
Dieta básica + naringenina	1,60	4,69		3,55
Dieta modificada + naringenina	-0,96	-2,22		-4,08

¹ Dias após o início da administração do flavonóide.

Quadro 31 – Peso (g), consumo alimentar (g) e concentração dos constituintes sangüíneos (mg.dL⁻¹) dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina e dieta básica ou modificada (experimento 3)

	Dias ¹	Dieta básica		Dieta modificada		
		Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	
Peso						
			-3	266,0 ± 79,7 ² a ³	300,8 ± 79,1 a	278,9
			26	298,00 ± 116,82 a	360,80 ± 114,90 b	314,25
Consumo						
			0 a 25	575,60 ± 169,68	494,99 ± 129,53	651,93
Creatinina	-1	0,67 ± 0,17 a	0,66 ± 0,16 a	0,89 ± 0,23 a	0,80 ± 0,12 a	
	26	0,55 ± 0,11 a	0,58 ± 0,13 a	0,56 ± 0,05 b	0,58 ± 0,07 b	
Colesterol	-1	120,16 ± 12,64 a	132,40 ± 19,82 a	136,39 ± 15,62 a	121,99 ± 11,31 a	
	26	123,76 ± 26,56 a	122,56 ± 17,02 a	116,59 ± 16,99 b	132,64 ± 35,44 a	
Triacilgliceróis	-1	110,18 ± 65,14 a	125,02 ± 57,51 a	133,89 ± 40,74 a	173,33 ± 96,24 a	
	26	101,78 ± 30,01 a	145,96 ± 77,47 a	154,43 ± 51,10 a	215,28 ± 141,5 a	
Glicose	-1	203,12 ± 188,6 a	145,52 ± 46,89 a	326,09 ± 179,9 a	289,64 ± 150,0 a	
	26	246,18 ± 206,9 a	138,28 ± 25,36 a	324,09 ± 173,6 a	314,60 ± 181,1 a	
Albumina (g.dL ⁻¹)	-1	4,50 ± 0,22 a	4,58 ± 0,25 a	4,65 ± 0,32 a	4,39 ± 0,24 a	
	26	3,71 ± 0,28 b	3,85 ± 0,17 b	3,57 ± 0,48 b	3,56 ± 0,41 b	
Nº de ratos		5	5	8	8	

¹ Dias após o início da administração de naringenina.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sangüíneo, pelo teste t (P < 0,05).

Quadro 32 – Resumo das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 3)¹

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Dieta (D)	1	13135,02	0,683	0,417
	Flavonóide (F)	1	3589,062	0,187	0,670
	D x F	1	24192,55	1,259	0,274
	Erro a	22	19215,32		
	Época (E)	1,56*	3642,289	18,210	1,65 x 10 ⁻⁵
	E x D	1,56*	141,990	0,710	0,466
	E x F	1,56*	311,161	1,556	0,226
	E x D x F	1,56*	230,555	1,153	0,317
	Erro b	34,4*	200,012		
	C.V. a (%)			45,24	
C.V. b (%)			4,62		
Creatinina	Dieta (D)	1	0,033	1,891	0,184
	Flavonóide (F)	1	0,004	0,242	0,628
	D x F	1	0,013	0,714	0,408
	Erro a	21	0,018		
	Época (E)	2	0,078	6,615	0,003
	E x D	2	0,021	1,767	0,183
	E x F	2	0,028	2,425	0,101
	E x D x F	2	0,005	0,408	0,668
	Erro b	42	0,012		
	C.V. a (%)			22,30	
C.V. b (%)			18,21		
Colesterol	Dieta (D)	1	3005,541	2,023	0,170
	Flavonóide (F)	1	231,887	0,156	0,697
	D x F	1	384,632	0,259	0,616
	Erro a	21	1485,595		
	Época (E)	2	110,071	0,325	0,725
	E x D	2	357,595	1,055	0,357
	E x F	2	15,175	0,045	0,956
	E x D x F	2	75,819	0,224	0,801
	Erro b	42	339,043		
	C.V. a (%)			30,36	
C.V. b (%)			14,50		
Triacilgliceróis	Dieta (D)	1	27434,88	1,268	0,273
	Flavonóide (F)	1	38877,14	1,798	0,195
	D x F	1	1314,733	0,061	0,808
	Erro a	20	21628,32		
	Época (E)	1,93*	936,008	0,865	0,426
	E x D	1,93*	353,658	0,327	0,716
	E x F	1,93*	70,236	0,065	0,932
	E x D x F	1,93*	516,730	0,477	0,618
	Erro b	38,7*	1082,265		
	C.V. a (%)			90,06	
C.V. b (%)			20,15		

¹ O experimento foi considerado como delineamento em parcelas subdivididas tendo as épocas de avaliação (dias após o início da aplicação do flavonóide: 6, 12, 19 e 26 dias para o peso e 6, 12 e 26 dias para os constituintes sanguíneos) como subparcelas.

* Os graus de liberdade foram ajustados devido a matriz de covariância residual não preencher a condição H – F (HUYNH & FELDT, 1970).

Quadro 32 - Continuação

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Glicose	Dieta (D)	1	51987,95	0,503	0,486
	Flavonóide (F)	1	241282,7	2,334	0,142
	D x F	1	43205,34	0,418	0,525
	Erro a	21	103385,8		
	Época (E)	2	3191,756	1,453	0,245
	E x D	2	21,258	0,010	0,990
	E x F	2	1361,724	0,620	0,543
	E x D x F	2	149,918	0,068	0,934
	Erro b	42	2196,785		
	C.V. a (%)			125,34	
	C.V. b (%)			18,27	
Albumina	Dieta (D)	1	0,205	1,250	0,277
	Flavonóide (F)	1	0,243	1,484	0,237
	D x F	1	0,006	0,039	0,845
	Erro a	20	0,164		
	Época (E)	2	1,483	41,795	1,59E-10
	E x D	2	0,003	0,072	0,930
	E x F	2	0,003	0,080	0,923
	E x D x F	2	0,016	0,450	0,641
	Erro b	40	0,035		
	C.V. a (%)			10,35	
	C.V. b (%)			4,82	

Quadro 33 – Resumo das análises de covariâncias¹ do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função dos tratamentos, ao final² do experimento 3

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Regressão ³	1	130829,8	129,740	1,89 x 10 ⁻¹⁰
	Dieta	1	81,914	0,081	0,778
	Tratamentos ⁴	1	1538,135	1,525	0,230
	Dieta x Tratamento	1	838,076	0,831	0,372
	Resíduo	21	1008,397		
	C.V. (%)			10,01	
Triacilgliceróis	Regressão ³	1	55261,11	6,127	0,022
	Dieta	1	7179,021	0,796	0,382
	Tratamentos ⁴	1	8110,992	0,899	0,354
	Dieta x Tratamento	1	0,494	5,48 x 10 ⁻⁵	0,994
	Resíduo	21	9019,123		
	C.V. (%)			58,84	
Glicose	Regressão ³	1	568930	68,613	4,69 x 10 ⁻⁸
	Dieta	1	1287,06	0,155	0,696
	Tratamentos ⁴	1	19,655	0,002	0,962
	Dieta x Tratamento	1	9491,263	1,145	0,297
	Resíduo	21	8291,889		
	C.V. (%)			33,67	

¹ Foi considerada como covariável, a respectiva variável determinada no início do experimento: o peso 1 dia após e 1 dia antes do início da administração dos flavonóides.

² Determinadas 27 dias após o início da aplicação dos flavonóides.

³ Correspondente a covariável.

⁴ Naringenina e testemunha diabética.

Quadro 34 – Efeito da alteração de dieta no peso (g), consumo alimentar (g) e constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) em ratos diabéticos que não receberam naringenina (experimento 3)

Variável	Dias após mudança da dieta	Alteração da dieta ¹	
		De básica para modificada	De modificada para básica
Peso	0	298,00 ± 116,82 ² a ³	314,25 ± 65,42 a
	7	304,60 ± 112,16	305,29 ± 78,85
	14	304,80 ± 116,24 b	303,86 ± 84,07 a
Consumo	-14 a -1	292,52 ± 79,28 a	352,10 ± 101,26 a
	0 a 13	349,92 ± 135,03 b	353,97 ± 93,79 a
Creatinina	0	0,55 ± 0,11 a	0,56 ± 0,05 a
	14	0,63 ± 0,20 a	0,59 ± 0,15 a
Colesterol	0	123,76 ± 26,56 a	116,59 ± 16,99 a
	14	117,90 ± 17,51 a	120,41 ± 15,37 a
Triacilgliceróis	0	101,78 ± 30,01 a	154,43 ± 51,10 a
	14	103,46 ± 51,55 a	104,87 ± 28,48 b
Glicose	0	246,18 ± 206,92 a	324,09 ± 173,60 a
	14	234,02 ± 179,35 a	315,70 ± 198,69 a
Albumina (g.dL ⁻¹)	0	3,71 ± 0,28 a	3,57 ± 0,48 a
	14	3,76 ± 0,20 a	3,61 ± 0,28 a
N ^o de ratos		5	7

¹ Os ratos se alimentaram com a primeira dieta por 38 dias.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada característica, pelo teste t (P > 0,05).

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, as testemunhas normais apresentaram glicemia média de 107,7 a 151,1 mg.dL⁻¹. Outros autores observaram valores de 53,9 a 158,7 mg.dL⁻¹ (MIYAKE et al., 1998; FRINHANI, 1998; BABU & SRINIVASAN, 1997; PESSOTO et al., 1997). Essa amplitude observada na glicemia de jejum de ratos normais pode ser devido a variabilidade individual ou devido ao tempo transcorrido entre a coleta e centrifugação do sangue que permite que ocorra glicólise.

MIYAKE et al. (1998), PARKS & DRAKE (1982), DRAKE et al. (1983), GONZÁLES et al. (1996), SILVA et al. (1998), ZARZUELO et al. (1996), GOLFMAN et al. (1998), GABBAY et al. (1966) e MURTIASHAW et al. (1983) observaram níveis de glicose no soro de ratos diabéticos variando de 119 ± 10 a 590,0 ± 21 mg.dL⁻¹ (média ± erro-padrão). Entretanto, BABU & SRINIVASAN (1997), BERTUGLIA (1995), CHUA & SHRAGO (1978), MISHKINSKY et al. (1974), NECHIFOR et al. (1995), RITTER et al. (1986), SPADELLA et al. (1996), TAHA (1991), VAN ASSCHE et al. (1979) e YOUNG & DIXIT (1980) observaram níveis de glicose no soro de ratos diabéticos variando de 66,6 ± 26 a 109 ± 11 mg.dL⁻¹ (média ± erro-padrão).

RITTER et al. (1986) observaram glicemia de 60 a 86 mg.dL⁻¹ em ratos testemunhas normais. No presente estudo, nos 3 experimentos foram selecionados como diabéticos, ratos com glicemia inicial acima de 115 a 120 mg.dL⁻¹. Esses ratos apresentaram glicemia inicial de 128,6 ± 8,9 a 273,7 ± 93,3 mg.dL⁻¹ (média ± I.C.(μ)_{0,95}), dependendo da dieta e do experimento. No decorrer dos experimentos, a glicemia atingiu 403,7 ± 227,3 mg.dL⁻¹ na testemunha diabética e até 858,3 mg.dL⁻¹ em um dos ratos. Desses 76 ratos, 16 apresentaram glicemia inicial superior a 330 mg.dL⁻¹ e final, assim como mais outros 4 ratos, superior a 450 mg.dL⁻¹. Nos demais, a glicemia permaneceu, geralmente, abaixo de 200 mg.dL⁻¹. Assim, os ratos que compunham um mesmo tratamento apresentaram alta variabilidade.

Nos 3 experimentos, cada tratamento foi aplicado a ratos diabéticos com glicemias iniciais distintas entre si. Conseqüentemente, as glicemias avaliadas subseqüentemente apresentavam grande variabilidade dentro do tratamento evidenciado pelo intervalo de confiança das médias. Isto também ocorreu com outros constituintes sangüíneos. Essa variabilidade compõe o erro experimental. Quanto maior esse erro, maior tem de ser a diferença entre médias de tratamentos para que seja considerada significativa estatisticamente. Por isso, mesmo tendo ocorrido substanciais diferenças entre médias dos tratamentos aplicados aos ratos diabéticos, muitas delas, pelo teste t, e todos, pela análise de medidas repetidas, foram consideradas como não significantes (P > 0,0,5). A análise de covariância (ANCOVA) do peso e de alguns constituintes sangüíneos ao final do experimento, considerando como covariável o valor de cada característica no início do experimento, permitiu reduzir o erro experimental causado pela variabilidade existente nos ratos que compunham um mesmo tratamento, no início do experimento. Isso é evidenciado pelo menor coeficiente de variação (C.V.) tanto em relação ao C.V. da análise de variância (ANOVA), cujos resultados

não foram apresentados, quanto em relação ao C.V. da análise de medidas repetidas. Mesmo assim, a ANCOVA não detectou diferenças significativas ($P > 0,05$). Ou seja, o erro experimental ainda permaneceu elevado. Isto pode ser atribuído ao fato observado que vários ratos diabéticos recebendo o mesmo tratamento e possuindo valores iniciais semelhantes, para uma dada característica, apresentaram valores muito diferenciais com relação a mesma, no transcorrer dos experimentos. O fato da variabilidade amostral dos constituintes sanguíneos na testemunha normal ter sido muito menor que nos tratamentos aplicados aos ratos diabéticos é uma forte evidência que não houve erros nas determinações destes constituintes.

A fim de reduzir o erro experimental em experimentos futuros, duas providências são necessárias: aumentar o número de repetições por tratamento e homogeneizar os níveis sanguíneos iniciais de glicose. Embora, desse modo, os valores iniciais de colesterol, triacilgliceróis, albumina e creatinina não poderiam ser padronizados, pois, apresentam baixa correlação com a glicemia. Uma outra alternativa seria montar o experimento em blocos casualizados com relação à glicemia inicial. Essas medidas requerem o uso de um grande número de ratos por experimento. Isto muitas vezes não é possível adotar, devido a limitações de espaço físico, infra-estrutura, recursos financeiros e mão-de-obra disponíveis para a condução do experimento. Para se ter uma idéia, nos experimentos conduzidos neste estudo, em cada coleta de sangue de cerca de 80 ratos e centrifugação para obtenção do soro, trabalharam 8 pessoas, durante cerca de 4 horas, pois, é necessário que o sangue seja centrifugado rapidamente após a coleta para evitar a diminuição do seu nível de glicose, devido ao consumo *in vitro* por leucócitos.

Na testemunha normal (que não recebeu aloxano) presente somente nos 2 primeiros experimentos, a dieta não teve efeito na variação da glicemia no decorrer de ambos experimentos. O acréscimo observado na glicemia média final dos que consumiam dieta básica, no primeiro experimento, se deve a apenas um único rato. Evidencia-se, com isso, que a sacarose presente na dieta modificada, por si só, não influenciou a glicemia, no transcorrer dos experimentos. Embora, a dieta modificada tenha proporcionado maior glicemia, em relação a dieta básica, 10 dias após o início de seu fornecimento, no primeiro experimento. No entanto, essa glicemia foi menor que a induzida por aloxano. Esses resultados estão de acordo com registros na literatura. Entre ratos alimentados com dieta rica em sacarose ou com dietas controle, não houve diferenças entre as glicemias pós-prandial (MACHO et al., 1993; MADAR, 1989; SEBOKOVÁ et al., 1993a; SORIA et al., 1996; VADLAMUDI et al., 1993) ou de jejum (SEBOKOVÁ et al., 1993b; BERDANIER & BURRELL, 1980; CARSWELL et al., 1989; PODOLIN et al., 1998). Contudo, hiperglicemia pode ser induzida com dietas ricas em frutose (IKEDA & FUJIYAMA, 1998) ou glicose (LAMELA et al., 1986). CACINI et al. (1993) induziram hiperglicemia em ratos com o uso de dietas, a qual não excedeu 165 mg.dL^{-1} , enquanto estreptozotocina induziu níveis de glicose superiores a 400 mg.dL^{-1} . Segundo CACINI et al. (1993) e LOMBARGO et al. (1996), elevações crônicas na glicemia podem ser mantidas em presença de níveis normais de insulina no sangue. Dietas ricas em sacarose enfraquecem a ação da insulina, promovendo uma redução na eficiência da captação de glicose pelas células (SEBOKOVÁ et al., 1993a; SEBOKOVÁ et al., 1993b; LIN & ANDERSON, 1977; LOMBARGO et al., 1996; WRIGHT et al., 1983).

Dentre os ratos que receberam aplicação de aloxano, os que consumiam dieta modificada apresentaram glicemia inicial mais elevada e maior percentual de animais diabéticos, dentre os sobreviventes, 62 a 84% contra cerca de 50% dos que consumiam dieta básica, nos 3 experimentos. Isto é uma evidência que a sacarose presente na dieta modificada, pode potencializar o efeito do aloxano na indução de hiperglicemia. Segundo ANDERSON et al. (1973), é possível que a ingestão crônica de dieta rica em sacarose contribua para maior incidência de diabetes em certas populações. Dieta rica em sacarose promoveu maior

expressão de diabetes em ratos com hipertensão espontânea comparada à dieta rica em amido (CARSWELL et al., 1989). GODA et al. (1982) observaram incidência de diabetes de 100 e 80%, em ratos alimentados com dieta rica em sacarose e rica em amido, respectivamente, durante uma semana antes da administração de estreptozotocina.

Segundo BORG et al. (1985) e GORRAY et al. (1983), a glicose pode anular o efeito do aloxano, protegendo as células β da citotoxicidade do aloxano. No presente estudo, esse efeito não foi observado nos ratos que consumiram dieta modificada, possivelmente, devido ao jejum de 16 horas imposto antes da aplicação do aloxano. DIXIT & KAUNG (1985) observaram 100% de incidência de diabéticos, após a aplicação de aloxano em jejum, em ratos alimentados com dieta semelhante à dieta modificada.

Ao final dos 3 experimentos, a glicemia dos ratos diabéticos que consumiam dieta modificada foi maior que a dos que consumiam dieta básica. Esse fato não surpreende, pois a restrição de sacarose na dieta é recomendada para pacientes diabéticos. Contudo, não houve variações significativas na glicemia, 14 dias após a troca das dietas. Isso pode ser devido ao curto intervalo de tempo considerado.

Células β de pâncreas de ratos neonatal, cultivadas em monocamadas, tratadas com aloxano *in vitro* apresentaram redução na taxa de liberação da insulina durante as primeiras 24 horas (GORRAY et al., 1983). Nas primeiras 24 horas, após a aplicação do aloxano, devido ao rompimento das células β produtoras de insulina no pâncreas, há uma maciça liberação de insulina que pode causar hipoglicemia fatal. A mortalidade nos ratos, na primeira semana após a aplicação do aloxano, variou de 18 a 29%, de acordo com a dieta e com o experimento. A mortalidade foi menor no primeiro experimento, onde a glicemia média foi menor ($139,6 \text{ mg.dL}^{-1}$), sugerindo resistência desses ratos ao aloxano. No terceiro experimento, a glicemia média foi a mais elevada ($208,22 \text{ mg.dL}^{-1}$) que no segundo ($172,3 \text{ mg.dL}^{-1}$). Porém, a mortalidade foi maior no segundo (29%) que no terceiro (22%), no qual foi fornecido soro glicosado via oral, nas primeiras 24 horas, em substituição à água destilada. A diferença nas taxas de mortalidade dos 3 experimentos, também pode ser devido à variabilidade da resistência ao aloxano, entre os ratos. GOLFMAN et al. (1998) administraram solução de dextrose a 50% e salina entre 12 e 24 horas após a administração de aloxano, em ratos, e obtiveram 100% de diabetogênese e menos de 2% de mortalidade.

Ratos que se alimentaram de dieta modificada, apresentaram menor mortalidade em relação aos que se alimentaram de dieta básica, no primeiro experimento. A alta concentração de sacarose na dieta modificada pode ter amenizado a hipoglicemia fatal. Nos segundo e terceiro experimentos, a taxa de mortalidade foi semelhante, provavelmente por ter sido fornecido, após a aplicação do aloxano, soro glicosado a todos os ratos no terceiro e 4g de sacarose adicionado à dieta básica, no segundo experimento, embora alguns ratos não tenham consumido esta dieta nas primeiras 24 horas.

Portanto, esses resultados sugerem que em experimentos futuros, na indução de diabetes seja utilizado aloxano na dose de 60 mg.dL^{-1} . No período que antecede a primeira determinação de glicemia, os ratos devem ser alimentados com dieta modificada (rica em sacarose) e deixados em jejum por 16 horas antes da aplicação do aloxano, após a qual devem ter à disposição soro glicosado em substituição à água destilada, por 24 horas. Este método produziu maior número de ratos diabéticos que os obtidos por KIM et al. (1994); MARCIANO (1997) e FRINHANI (1998), embora um pouco menor que os obtidos por MELLO & LUCIANO (1995) que usaram dieta semelhante, porém apenas 40 mg.kg^{-1} de aloxano.

TAHA (1991), VAN ASSCHE et al. (1979) e SOARES et al. (2000) injetaram, em ratos, concentração menor e maior de aloxano ou estreptozotocina, para produzir diabetes moderada com glicemias de $133,7 \pm 14,4 \text{ mg.dL}^{-1}$ a $195 \pm 12 \text{ mg.dL}^{-1}$ e severa com glicemias de $318,27 \pm 4,41 \text{ mg.dL}^{-1}$ a $590 \pm 21 \text{ mg.dL}^{-1}$ (média \pm erro-padrão).

Nos 3 experimentos, dentre os ratos que consumiram dieta básica, os que receberam naringenina apresentaram glicemia final substancialmente menor que aqueles que não receberam, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Alguns autores observaram que os flavonóides eriocetrina, hesperidina, diosmina, extraídos de citros (que contém naringenina) ou cebola adicionados à dieta, por semanas ou meses, não influenciaram a glicemia (MIYAKE et al., 1998; BABU & SRINIVASAN, 1997; VERTOMMEN et al., 1994). Uma das razões para o fato da naringenina não ter apresentado efeito sobre a glicemia, poderia ser devido a sua não biodisponibilidade. Nem sempre os flavonóides são absorvidos eficientemente, devido a sua natureza hidrofílica, formação de complexos, ou alto peso molecular, como os glicosídeos e polifenóis ligados ou altamente polimerizados (BRAVO et al., 1994; FORMICA & REGELSON, 1995; LI et al., 1998; McANLIS et al., 1998; JENKINS & ATWAL, 1995). A falta de sucesso do tratamento com flavonóide pode estar associada à falha do composto em alcançar seu alvo (HAVSTEEN, 1983). Se o alvo não é o trato gastrointestinal ou o fígado, talvez seja interessante estudar sua aplicação intravenosa ou intramuscular local. A detecção de naringenina na urina do rato foi de 10 e 20%, quando administrada via oral e intravenosa, respectivamente (CHOUDHURY et al., 1999).

Por outro lado, diversos autores atribuíram ao conteúdo de flavonóides, o efeito hipoglicemiante do extrato de diversas plantas administrado a camundongos e ratos com diabetes induzido com aloxano. Esses autores sugerem que não ocorreu destruição total das células β por aloxano, possibilitando a sua regeneração (AJABNOOR & TILMISANY, 1988; ABDEL-BARRY et al., 1997; GOMES et al., 1995; ZARZUELO et al., 1996; SOTO et al., 1998; GRAY & FLATT, 1999; LAMELA et al., 1986; SOARES et al., 2000), para a qual poderia ter contribuído o efeito antioxidante dos flavonóides. Isto foi observado com o uso de luteolina 5-rutinoside (ZARZUELO et al., 1996). O extrato de *Silybum marianum* funciona como carreador de radicais livres, aumentando a disponibilidade de glutatona, um desintoxicante de produtos reativos de oxigênio intermediários da lipoperoxidação, e previne alterações na membrana. A glutatona reage com radicais livres e é substrato da glutatona peroxidase e glutatona S-transferase, que participam nos mecanismos de defesa celular contra produtos oxigenados intermediários do metabolismo (SOTO et al., 1998).

Ambas dietas possuíam igual quantidade de calorias e diferentes de sacarose: 47,95% e 10% nas dieta modificada e básica, respectivamente. Esta pode ser a razão do maior ganho de peso em testemunhas normais que consumiam dieta modificada em relação aos que consumiam dieta básica, uma vez que ambas possuíam a mesma quantidade de calorias. A insulina facilita o transporte de aminoácidos para as células, particularmente para o músculo; estimula a síntese protéica nos músculos esquelético e cardíaco, no tecido adiposo e no fígado e também interfere na replicação e na diferenciação celular resultando em ganho de peso (PAGANO et al., 1998; MARZZOCO & TORRES, 1999). O ganho de peso nas testemunhas normais foi de 22 a 31%, o que corresponde a 2,1 a 3,1 g.dia⁻¹, sendo semelhante em relação, a ambas dietas, embora a dieta básica tenha proporcionado ganho de peso um pouco inferior à dieta modificada, no segundo experimento. Outros autores observaram ganho de peso em ratos normais de 3,6 a 6,4 g.dia⁻¹ (PARKS & DRAKE, 1982; DRAKE et al., 1983; MURTIASHAW et al., 1983; MELLO & LUCIANO, 1995).

Em ratos diabéticos a dieta básica proporcionou maior ganho de peso que a modificada, embora essa diferença não seja significativa. A naringenina proporcionou maior ganho de peso, em relação à testemunha, embora de forma substancial apenas no segundo experimento. Segundo RITTER et al. (1986), ratos que receberam aplicação de aloxano, mas não desenvolveram hiperglicemia (glicemia de entre 66 e 96 mg.dL⁻¹), não apresentaram ganho de peso diferente da testemunha normal. Isto indica que a variação de peso não é função do aloxano, mas da hiperglicemia induzida pelo mesmo. PESSOTO et al. (1997), PARKS &

DRAKE (1982), DRAKE et al. (1983), BABU & SRINIVASAN (1997), FEILLET-COUDRAY et al. (1999), MURTIASHAW et al. (1983) e MELLO & LUCIANO (1995) observaram que ratos com diabetes induzido, por estreptozotocina ou aloxano, apresentam redução do peso final ou menor ganho em relação aos controles. Hiperglicemia resulta em enfraquecimento na utilização de glicose no tecido não hepático e transporte de glicose (PARKS & DRAKE, 1982). A perda de peso resulta de efeitos catabólicos do diabetes (PARKS & DRAKE, 1982). O uso de cebola, diosmina (VERTOMMEN et al., 1994; BABU & SRINIVASAN, 1997), extrato de citros (0,2%), eriocitrina (0,2%) ou hesperidina (0,2%) (MIYAKE et al., 1998) na dieta não afetou o ganho de peso de ratos diabéticos.

Embora a redução no ganho de peso seja um sintoma típico do diabetes (MIYAKE et al., 1998), no presente estudo, o ganho de peso da testemunha normal foi menor que ratos diabéticos, com o uso da dieta básica e maior, com o uso da dieta modificada. Entretanto, o consumo alimentar total dos ratos diabéticos foi positivamente correlacionado com a glicemia e foi maior que a testemunha normal. O aumento no consumo é um sintoma típico do diabetes (MIYAKE et al., 1998). Diabetes induzido por aloxano em ratos induz a hiperfagia (PENG et al., 1975).

Após a troca de dietas, os ratos diabéticos que passaram a receber dieta básica diminuíram o consumo e os que passaram a receber dieta modificada, aumentaram-no.

As correlações entre constituintes sanguíneos, consumo e peso foram influenciadas pela dieta e pelos tratamentos.

Em todos os 3 experimentos, independente do tratamento e da dieta, houve redução nos níveis de albumina e creatinina, que mesmo assim se mantiveram dentro dos limites considerados normais. A redução nos níveis de albumina e creatinina foi observada em ratos diabéticos (LIMA, 1985). Ratos com diabetes induzido por estreptozotocina apresentaram menores níveis plasmáticos de albumina ($40,2 \pm 1,7$ e $41,2 \pm 0,8$ g.L⁻¹) quando comparado com ratos normais ($44,6 \pm 1,2$ e $45,5 \pm 0,9$ g.L⁻¹) (média \pm erro-padrão) após 1 e 4 semanas da indução do diabetes, respectivamente (FEILLET-COUDRAY et al., 1999).

Em pacientes diabéticos, os capilares tornam-se mais permeáveis à albumina. O uso de Daflon 500[®], uma fração de flavonóides contendo 90% de diosmina e 10 % de hesperidina, reverteu esse problema em 55% dos pacientes tratados (VALENSI et al., 1996). Segundo MURTIASHAW et al. (1983) ocorre diminuição da síntese de albumina em ratos diabéticos. Apesar disso, esses autores observaram que a concentração de albumina plasmática manteve-se mesmo após 10 dias da aplicação de 75 mg.kg⁻¹ de estreptozotocina em ratos. A explicação sugerida foi uma redução na taxa de degradação e no volume de distribuição corporal total. A massa de albumina no corpo foi reduzida por contração em 25% dos compartimentos vasculares e extravasculares. A contração no espaço extracelular em diabéticos pode ser devido a perda de massa muscular e, ou, relativa desidratação.

BABU & SRINIVASAN (1997) não observaram alterações na concentração de albumina ou creatinina em ratos diabéticos, recebendo adição de 15% de pimentão na dieta por 8 semanas. No entanto com uma dieta contendo 3% de cebola, os ratos apresentaram maior concentração de albumina e uréia plasmática, sugerindo um menor grau de catabolismo e redução da concentração de creatinina plasmática. Isto sugere aumento da função renal neste grupo.

O nível de creatinina foi um pouco maior em ratos diabéticos em relação à testemunha normal. São comuns valores elevados de uréia, creatinina e ácido úrico na diabetes, mesmo na ausência de insuficiência renal (ALMEIDA, 1997), pois sua concentração plasmática é interpretada como taxa de filtração glomerular (MILLER, 1986) e na diabetes, há catabolismo protéico (ALMEIDA, 1997). Os aminoácidos são desaminados e a parte não nitrogenada da molécula forma glicose e ácidos graxos. Isso leva ao aumento da glicose e

ácidos graxos parcialmente oxidados no sangue, e ao aumento na excreção de nitrogênio na urina (MARZZOCO & TORRES, 1999). O uso de dieta modificada proporcionou redução significativa do nível de creatinina, no decorrer dos experimentos.

No decorrer dos 2 primeiros experimentos houve aumento nos níveis de triacilgliceróis, nos ratos normais que se alimentaram de dieta modificada, significativo apenas no experimento 1. AGHELI et al.,(1998), CARSWELL et al. (1989), LOMBARDO et al. (1996), PAGLIASSOTTI & PRACH (1995), PODOLIN et al. (1998), PUGAZHENTHI et al. (1993a), PUGAZHENTHI et al. (1993b), SEBOKOVÁ et al. (1993a), SEBOKOVÁ et al. (1993b) e SORIA et al. (1996) observaram hipertrigliceridemia em ratos que se alimentaram de dieta rica em sacarose. IKEDA & FUJIYAMA (1998) constataram alterações no metabolismo de gordura e aumento nos ácidos graxos livres, triacilgliceróis e outras gorduras na hiperglicemia induzida por frutose, devido à resistência à insulina. Hepatócitos de ratos quando expostos a altas concentrações de insulina, por períodos prolongados, tem estimulada a secreção de triacilgliceróis na VLDL (BJÖRNSSON et al., 1992).

A elevação nos níveis de triacilgliceróis dos ratos que se alimentaram de dieta rica em sacarose pode ser conseqüência direta de alterações metabólicas no fígado (OLIVEROS et al., 1995), tais como, aumento da secreção de triacilgliceróis ou enfraquecimento do mecanismo de remoção de triacilgliceróis da circulação (AGHELI et al., 1998; LOMBARDO et al., 1996; OLIVEROS et al., 1995; SORIA et al., 1996) ou ainda, devido à diminuição da atividade da lipase lipoprotéica, enzima que hidrolisa os triacilgliceróis da dieta (SORIA et al., 1996). Segundo PUGAZHENTHI et al. (1993a), dieta rica em sacarose aumenta a esterificação, levando ao aumento da secreção de triacilgliceróis, resultando em resistência à insulina. A resistência à insulina leva à hiperinsulinemia que contribui para uma dislipidemia. Há maior atividade de enzimas lipogênicas, chaves na síntese de gorduras hepáticas (PUGAZHENTHI et al., 1993a; PUGAZHENTHI et al., 1993b e LIN & ANDERSON, 1977).

Em ratos diabéticos, dos 3 experimentos, houve aumento no nível de triacilgliceróis para todos os tratamentos, exceto para os ratos que receberam naringenina no segundo experimento. No primeiro experimento, esse aumento foi muito menor para os ratos tratados com naringenina. Os ratos que tiveram sua dieta trocada de modificada para básica, apresentaram significativa diminuição do nível de triacilgliceróis. Com relação aos níveis de colesterol não houve consistência nos resultados dos 3 experimentos.

Alguns autores observaram que os níveis plasmáticos de colesterol total e triacilgliceróis foram maiores nos ratos com diabetes ($112,3 \pm 8,21$ e $214,3 \pm 8,94$ mg.dL⁻¹), quando comparado com ratos normais ($59,9 \pm 6,48$ e $113,0 \pm 8,94$ mg.dL⁻¹) (respectivamente, média \pm erro-padrão) (FEILLET-COUDRAY et al., 1999; PESSOTO et al., 1997; MIYAKE et al., 1998; BABU & SRINIVASAN, 1997). Em ratos, ocorre desorganização do ciclo glicose-ácido graxo após indução do diabetes. Os ácidos graxos são mobilizados dos triacilgliceróis e fosfolipídios do músculo e tecido adiposo para serem oxidados. Há aumento no conteúdo de ácidos graxos livres no sangue e redução no músculo e tecido adiposo, acompanhados de profundas alterações em sua distribuição nos fosfolipídios das membranas das células musculares (KARAGEUZYAN et al., 1998).

Os níveis plasmáticos de colesterol e triacilgliceróis de humanos, ratos ou camundongos com hipercolesterolemia ou com diabetes, recebendo suco ou flavonóides de uva, naringenina, naringina, *Capsicum annum* (pimentão) ou *Camellia sinensis* (chá preto), durante 1 ou 12 semanas, não se alteraram (KUROWSKA et al., 1997; BABU & SRINIVASAN, 1997; McANLIS et al., 1998). Porém cebola, extrato de citros, eriocetrina ou hesperidina produziram redução nos níveis de colesterol plasmático total em camundongos hipercolesterolêmicos ou ratos diabéticos. O efeito hipocolesterolêmico do suco de laranja pode ser devido a flavonóides (KUROWSKA et al., 1997; KARAGEUZYAN et al., 1998; BABU &

SRINIVASAN, 1997; MIYAKE et al., 1998). BABU & SRINIVASAN, 1997 sugerem que a cebola tem propriedades hipoglicemiantes e hipocolesterolemiantes. Os ácidos trihidroxiocetadecadienóico de *Bryonia alba* tiveram ação hipoglicemiante demonstrando sua capacidade de restaurar anormalidades metabólicas típicas do diabetes grave (KARAGEUZYAN et al., 1998).

Analisando-se individualmente os 20 ratos que apresentaram glicemia maior que 350 mg.dL⁻¹, foram constatadas algumas semelhanças, características de diabéticos. O ganho de peso, de um modo geral, foi negativo ou pequeno. O consumo alimentar foi maior. Os níveis de triacilgliceróis e colesterol tiveram um aumento em metade desses 20 ratos e nos outros permaneceram estáveis. Em 11 deles observou-se diminuição do nível de albumina e em 6, diminuição do nível de creatinina.

5. CONCLUSÃO

Foi estudado o efeito de 5 doses de aloxano (90 a 150 mg.kg⁻¹) na indução de diabetes em coelhos. Verificou-se não haver diferenças entre essas doses. Contudo, recomenda-se o uso de 90 a 105 mg.kg⁻¹, devido a essas doses terem causado menor mortalidade.

Foram conduzidos 2 experimentos para avaliar o efeito do flavonóide da naringenina e do amido de fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum*) na hiperglicemia, peso, e níveis sanguíneos de colesterol total, triacilgliceróis, creatinina e albumina, em coelhos diabéticos. Por meio de análises de covariâncias, teste t e comparação dos coeficientes de regressão linear não foram detectados efeitos significativos destes tratamentos, devido a alta variabilidade apresentada pelos coelhos que compunham um mesmo tratamento, em relação a essas características.

Considerando ambos experimentos, dentre 10 coelhos testemunha diabética, 4 coelhos apresentaram cerca de 50% e 1 apresentou 24% de redução na glicemia final em relação à inicial, que era de 271 a 535 mg.dL⁻¹ nesses 4 animais. Isto sugere que coelhos com severo diabetes induzido por aloxano podem recuperar-se espontaneamente.

Em 3 experimentos, foi estudado o efeito do flavonóide naringenina e de 2 dietas no peso e níveis sanguíneos de glicose, albumina, creatinina, colesterol total e triacilgliceróis em ratos com diabetes induzido por aloxano.

Ratos diabéticos que compunham um mesmo tratamento, apresentaram alta variabilidade com relação às características estudadas.

A dieta não afetou a glicemia dos ratos testemunha normal (aqueles que não receberam aloxano) no transcorrer dos experimentos.

Sugere-se para experimentos futuros, que na indução do diabetes, no período antecedente a primeira mensuração da glicemia, os ratos sejam alimentados com dieta modificada (rica em sacarose) e deixados em jejum antes da aplicação do aloxano, após a qual devem ter à disposição soro glicosado em substituição à água destilada, por 24 horas. Outros constituintes como insulina e hemoglobina glicosilada também devem ser analisados.

Em todos os experimentos, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, a administração de naringenina adicionada à dieta básica proporcionou redução da glicemia e aumento do peso final em relação à testemunha diabética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-BARRY, J.A., ABDEL-HASSAN, I.A., AL-HAKIEM, M.H.H. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p.149-155, 1997.
- ABDEL-HASSAN, I.A., ABDEL-BARRY, J.A., MOHAMMEDA, S.T. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.325-330, 2000.
- ADAMS, W.E., HEINDEL, N.D., TUTWILER, G., FAWTHROP, H. Alloxan analogues as potencial pancreatic-imaging radiopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.73, n.3, p.394-395, 1984.
- AGHELI, N., KABIR, M., BERNI-CANANI, S., PETITJEAN, E., BOUSSAIRI, A., LUO, J., BORNET, F., SLAMA, G., RIZKALLA, S.W. Plasma lipids and fatty acid synthase activity are regulated by short-chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, n.8, p. 1283-1288, 1998.
- AGULLO, G., GAMET-PAYRASTRE, L., MANENTI, S., VIALA, C., RÉMÉSY, C., CHAP, H., PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoids structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v.53, p.1649-1657, 1997.
- AHMAD, M., AKHTAR, M.S., MALIK, T., GILANI, A.H. Hypoglycaemic action of the flavonoid fraction of *Cuminum nigrum* seeds. **Phytotherapy Research**, v.14, n.2, p.103-106, 2000 (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- AJABNOOR, M.A., TILMSANY, A.K. Effect of *Trigonella foenum graecum* on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, p.45-49, 1988.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.1294p.
- AL-HABORI, M., RAMAN, A. Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 233-242, 1998.
- ALI, L., KHAN, A.K.A., HASSAN, Z., MOSIHUZZAMAN, M., NAHAR, N., NASREEN, T., NUR-e-ALAM, M., ROKEYA, B. Characterization of the hypoglycemic effects of *Trigonella foenum graecum* seed. **Planta Medica**, v.61, p.358-360, 1995.
- ALMEIDA, H.G.G. **Diabetes Mellitus**. Uma abordagem simplificada para profissionais de saúde. São Paulo: Atheneu, 1997. 95p.
- AMEER, B., WEINTRAUB, R.A., JOHNSON, J.V., YOST, R.A., ROUSEFF, R.L. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.60, p.34-40, 1996.

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. New recommendations and principles for diabetes management. **Nutrition Reviews**, v.52, n.7, p.238-241, 1994.
- ANDERSON, J.W., HERMAN, R.H., ZAKIN, D. Effect of high glucose and high sucrose diets on glucose tolerance of normal men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 26, n.6, p.600-607, 1973.
- ANDRÉOLETTI, L., HOBER, D., HOBER-VANDENBERGHE, C., FAJARDY, I., BELAICH, S., LAMBERT, V., VANTYGHM, M.C., LEFEBVRE, J., WATTRE, P. Cocksackie B virus infection and β cell autoantibodies in newly diagnosed IDDM adult patients. **Clinical and Diagnostic Virology**, v.9, p.125-133, 1998.
- ARAKAWA, T., YU, J., CHONG, D.K.X., HOUGH, J., ENGEN, P.C., LANGRIDGE, W.H.R. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. **Nature Biotechnology**, v.16, n.10, p.934-938, 1998.
- ARONOFF, S., ROSENBLATT, S., BRAITHWAITE, S., EGAN, J.W. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. **Diabetes Care**, v.23, n.11, p.1605-1611, 2000. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- ARRINGTON, L.R. **Introductory Laboratory Animal Science**: The breeding, care and management of experimental animals. Danville: Interstate. 1972. 203p.
- ASGARY, S., NADERI, GH, SARRAFZADEGAN, N., BOSHTAM, M., RAFIE, M. The effect of flavonoids on the prevention of insulin glycosylation. **Atherosclerosis**, v.136, p.S66, 1998. (Suppl. 1).
- ASGARY, S., NADERI, GH, SARRAFZADEGAN, N., GHASSEMI, N., BOSHTAM, M., RAFIE, M., AREFIAN, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.73, p.223-226, 1999.
- BABU, P.S., SRINIVASAN, K. Influence of dietary capsaicin and onion on the metabolic abnormalities associated with streptozotocin induced diabetes mellitus. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.175, p.49-57, 1997.
- BAEKESKOV, S., NIELSEN, J.H., MARNER, B., BILDE, T., LUDVIGSSON, J., LERNMARK, A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. **Nature**, v.298, n.8, p.167-169, 1982.
- BAEZA, N., MORISCOT, C. I., RENAUD, W. P., OKAMOTO, H., FIGARELLA, C. G., VIALETES, B. H. Pancreatic regenerating gene overexpression in the nonobese diabetic mouse during active Diabetogenesis. **Diabetes**, v.45, p.67-70, 1996.
- BALENTINE, D.A., WISEMAN, S.A., BOUWENS, L.C.M. The chemistry of the tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.37, n.8, p.693-704, 1997.
- BARRANCO, J.G. Glucose control guidelines: current concepts. **Clinical Nutrition**, v.17, p.7-17, 1998. (Suppl. 2).
- BASTYR, E.J., JOHNSON, M.E., TRAUTMANN, M.E., ANDERSON, J.H., VIGNATI, L. Insulin lispro in the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus after oral agent failure. **Clinical Therapeutics**, v.21, n.10, p.1703-1714, 1999.

- BELL, R.C., CARLSON, J.C., STORR, K.C., HERBERT, K., SIVAK, J. High-fructose feeding of streptozotocin-diabetic rats is associated with increased cataract formation and increased oxidative stress in the kidney. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 84, n.4, p.575-582, 2000.
- BELLMANN, K., HUI, L., RADONS, J., BURKART, V., KOLB, H. Low stress response enhances vulnerability of islet cells in diabetes-prone BB Rats. **Diabetes**, v.46, p.232-236, 1997.
- BERDANIER, C.D., BURRELL, B.R. Effect of adrenalectomy on the responses of BHE rats to either a sucrose or starch diet. **Journal of Nutrition**, v. 110, n.2, p.298-304, 1980.
- BERGENSTAL, R., ODDONE, E., EDELMAN, D., LONG, J., PRICE, J.F. Desenvolvimento de um teste para o diabetes, rápido, não invasivo, utilizando-se o espectroscópio de fluorescência. **Diabetes Clínica**, v.3, n.4, p.194, 1999.
- BERTUGLIA, S, MALANDRINO, S, COLANTUONI, A. Effects of the natural flavonoid delphinidin on diabetic microangiopathy. **Arzneimittelforschung**, v. 45, n.4, p. 481-485, 1995.
- BHIMJI, S., McNEILL, J. H. Isoproterenol-induced ultrastructural alterations in hearts of alloxan-diabetic rabbits. **General Pharmacology**, v.20, n.4, p. 479-485, 1989.
- BJÖRNSSON, O.G., DUERDEN, J.M., BARTLETT, S.M., SPARKS, J.D., SPARKS, C.E., GIBBONS, G.F. The role of pancreatic hormones in the regulation of lipid storage, oxidation and secretion in primary cultures of rat hepatocytes. **The Journal of Biochemistry**, v.281, p.381-386, 1992.
- BOKKENHEUSER, V.D., SHACKLETON, C.H.L., WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. **The Journal of Biochemistry**, v.248, p.953-956, 1987.
- BOLLI, G.B., OWENS, D.R. Insulin glargine. **The lancet**, v.356, p.443-445, 2000.
- BONDY, P. Disorders of carbohydrate metabolism. In: BONDY, P., ROSENBERG, L.E. **Diseases of Metabolism**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1969. p. 199-294.
- BORG, L. A. H. Effects *in vitro* of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic B-cells. **The Journal of Biochemistry**, v.182, p.797-802, 1979.
- BORG, L. A. H. Effects of alloxan on the islets of Langerhans. Inhibition of leucine metabolism and insulin secretion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.677, p.257-262, 1981.
- BORG, L. A. H., BONE, A. J. Effects of alloxan on the islets of langerhans: stimulation and inhibition of cyclic AMP production. **Journal of Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research**, v.10, n.4, p.361-369, 1985.
- BRAATEN, J.T., WOOD, P.J., SCOTT, F.W., RIEDEL, K.D., POSTE, L.M., COLLINS, M.W. Oat gum lowers glucose and insulin after an oral glucose load. **American Journal Clinical Nutritional**, v.53, p.1425-1430, 1991.
- BRAND, R.M., HAMEL, F.G. Transdermally delivered peroxovanadium can lower blood glucose levels in diabetic rats. **International Journal of Pharmaceutics**, v.183, p.117-123, 1999.
- BRANDÃO, M., BUENDIA, J.P.L., GAVILANES, M.L., ZURLO, M.A., CUNHA, L.H.S., CARDOSO, C. Novos enfoques para plantas consideradas daninhas. **Informe Agropecuário**, v.11, n.129, p.3-12, 1985.
- BRAVO, L., ABIA, R., EASTWOOD, M.A., SAURA-CALIXTO, F. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract: effect on colonic fermentation and faecal output. **British Journal of Nutrition**, v.71, n.6, p.933-946, 1994.

- BRODY, T. **Nutritional Biochemistry**. Califórnia: Academic Press, 1993. 660p.
- BRONNER, W.E., BEECHER, G.R. Extration and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. **Journal of chromatography A**, v.705, p. 247-256, 1995.
- BROWN, J.E., KHODR, H., HIDER, R.C., RICE-EVANS, A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties. **The Journal of Biochemistry**, v.330, p.1173-1178, 1998.
- BUSIK, J.V., HOOTMAN, S.R., GREENIDGE, C.A., HENRY, D.N. Glucose-specific regulation of aldose reductase in capan-1 human pancreatic duct cells in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v.100, n.7, p.1685-1692, 1997.
- CACINI, W., HARDEN, E.A., SKAU, K.A. Reduced renal accumulation and toxicity of cisplatin in experimental galactosemia. **Proceedings of the National Academy Science United State of American**, v.203, p.348-353, 1993.
- CAMERON, N.E., COTTER, M.A. Neurovascular dysfunction in diabetic rats. **Journal of Clinical Investigation**, v.96, p.1159-1163, 1995.
- CARSWELL, N., MICHAELIS, O. E., PRATHER, E.S. Effect of acarbose (BAY-g-5421) on expression of noninsulin-dependent diabetes mellitus in sucrose-fed SHR/N-corpulent rats. **Journal of Nutrition**, v.119, n.3, p.388-394, 1989.
- CARTER, W.J., YOUNATHAN, E.S. Studies on protection against the diabetogenic effect of alloxan by glucose. **Proceedings of the National Academy Science United State of American**, v.109, p. 611-612, 1962.
- CHADHA, S.B., CHATURVEDI, S., KATYAL, I., DUDHA, A. Regulation of blood glucose and lipid profile through administration of indigenous foods in NIDDM patients. **The Indian Journal Nutritional Dietetic**, v.35, p.9-13, 1998.
- CHOUDHURY, R., CHOWRIMOOTOO, G., SRAI, K., DEBNAUM, E., RICE-EVANS, C.A. Interactions of the flavonoid naringenin in the gastrointestinal tract and the influence of glycosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.265, p.410-415, 1999.
- CHUA, B., SHRAGO, E. Effects of experimental diabetes and food intake on rat intestine and serum alkaline phosphatase. **Journal of Nutrition**, v. 108, p. 196-202, 1978.
- COLCA, J.R., KOTAGAL, N., BROOKS, C.L., LACY, P.E., LANDT, M., McDANIEL, M.L. Alloxan inhibition of a Ca^{++} - and calmodulin-dependent protein kinase activity in pancreatic islets. **The Journal of Biological Chemistry**, v.258, n.12, p.7260-7263, 1983.
- CONTRERAS, R., FUENTES, O., MANN, G.E., SOBREVIA, L. Diabetes and insulin-induced stimulation of L-arginine transport and nitric oxide synthesis in rabbit isolated gastric glands. **Journal of Physiology**, v.498, n.3, p. 787-796, 1997.
- COOK, N.C., SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.7, p.66-76, 1996.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.3.
- COSTA E FORTI, A., FONTELES, M.C. Decreased endothelium dependent relaxation (nitric oxide) in diabetic kidneys. **Hormone Metabolism Research**, v.30, n.1, p.55-57, 1998.

- COX, P.A., BALICK, M.J. The ethnobotanical approach to drug discovery. **Scientific American**, p. 82-87, 1994.
- DALL'AGNOL, R., POSER, G.L.V. The use of complex polysaccharides in the management of metabolic diseases: the *Solanum lycocarpum* fruits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.337-341, 2000.
- DAVIS, S.N., GRANNER, D.K. Insulina, Fármacos hipoglicemiantes orais e a farmacologia do pâncreas endócrino In: HARDMAN, J.G. LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw – Hill Interamericana, 1996. v.2.
- DIXIT, P. K., KAUNG, H. L. C. Rat pancreatic β -cells in protein deficiency: study involving morphometric analysis and alloxan effect. **Journal of Nutrition**, v.115, p.375-381, 1985.
- DRAKE, P. G., POSNER, B. I. Insulin receptor-associated protein tyrosine phosphatase (s): role in insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.182, n.1-2, p.79-89, 1998.
- DRAKE, R.L., THOMPSON, E.W., PARKS, W. C. Abnormal hepatic lipid accumulation following treatment of diabetic rats with insulin and a high-carbohydrate, fat-free diet. **The American Journal of Anatomy**, v.168, p.75-81, 1983.
- DUNN, C.J., FAULDS, D. Nateglinide. **Drugs**, v.60, n.3, p.607-615, 2000 (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- ENSMINGER, A. H., ENSMINGER, M. E., KONLANDE, J. F. et al. **Diabetes mellitus: foods and nutrition encyclopedia**. London: RCC, 1994. p.555-575.
- ESAKI, S., NISHIYAMA, K., SUGIYAMA, N., NAKAJIMA, R., TAKAO, Y., KAMIYA, S. Preparation and taste of certain glycosides of flavanones and of dihydrochalcones. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.8, p.1479-1485, 1994.
- EWALD, C., FJELKNER-MODIG, S., JOHANSSON, K., SJÖHOLM, I., AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, v.64, p.231-235, 1999.
- FAO. A folder available on the Internet (last updated: april, 2000, url: <http://apps.fao.org>).
- FEILLET-COUDRAY, C., ROCK, E., COUDRAY, C., GRZELKOWSKA, K., AZAIS-BRAESCO, V., DARDEVET, D., MAZUR, A. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v.284, p.31-43, 1999.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemistry Toxicology**, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.
- FOSS, M.C. **Diabetes no Brasil**. Recent on the role of sugar in the modern diet. São Paulo: s.ed., 1989.
- FRAIGE FILHO, F. A importância do controle da hiperglicemia pós-prandial. **Diabetes Clínica**, v.4, n,1, p.40-49, 2000 b.
- FRAIGE FILHO, F. Ano 2000, a revolução terapêutica. **Diabetes Clínica**, v.4, n,1, p.3, 2000 a.
- FRINHANI, E.M.D. **Efeito de antocianinas de uvas roxas (enocianinas) de de antocianinas extraídas de trapoeraba (*Tradescantia pallida*) em ratos normais e diabéticos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 84p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- GABBAY, K. H., MEROLA, L. O., FIELD, R. A. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. **Science**, v.151, p.209-210, 1966.

- GALVEZ, J., DE-LA-CRUZ, J.P., ZARZUELO, A., SANCHEZ-DE-LA-CUESTA, F. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v.51, n.2, p.127-133, 1995.
- GAMET-PAYRASTRE, L., MANENTI, S., GRATACAP, M.P., TULLIEZ, J., CHAP, H., PAYRASTRE, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. **General Pharmacology**, v.32, p.279-286, 1999.
- GEE, J.M., DUPONT, M.S., RHODES, M.J.C., JONHSON, I.T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. **Free Radical Biology & Medicine**, v.25, n.1, p.19-25, 1998.
- GINSBERG, B.H. The FDA panel advises approval of the first continuous glucose sensor. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v.1, n.2, p.203-204, 1999.
- GIRARD, B., MAZZA, G. Function grape and citrus products. In: MAZZA, G. **Functional Foods**. Lancaster: Technomic, 1998. 460p.
- GIRARD, P., SERCOMBE, R., SERCOMBE, C., LE-LEM, G., SEYLAZ, J., POTIER, P. A new synthetic flavonoid protects endothelium-derived relaxing factor-induced relaxation in rabbit arteries in vitro: evidence for superoxide scavenging. **Biochemical Pharmacology**, v.49, n.10, p.1533-1539, 1995.
- GODA, T., YAMADA, K., SUGIYAMA, M., MORIUCHI, S., HOSOYA, N. Effect of sucrose and acarbose feeding on the development of streptozotocin-induced diabetes in the rat. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology Tokyo**, v.28, n.1, p.41-56, 1982. (Abstract) (webof.science.fapesp.br).
- GOLFMAN, L., DIXON, I. M., TAKEDA, N., LUKAS, A., DAKSHINAMURTI. K., DHALLA, N. S. Cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchange and Na^+ - K^+ ATPase activities and gene expression in alloxan-induced diabetes in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.188, n.1-2, p. 91-101, 1998.
- GOMES, A., VEDASIROMONI, J.R., DAS, M., SHARMA, R.M., GANGULY, D.K. Anty-hyperglycaemic effect of black tea (*Camellia sinensis*) in rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.223-226, 1995.
- GONZÁLES, T A., GABRIEL-ORTIZ, G., PUEBLA-PÉREZ, A.M., HUÍZAR-CONTREAS, M.D., MUNGUÍA-MAZARIEGOS, M.R., MEJÍA-ARREGUÍN, S., CALVA, E. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, p.27-33, 1996.
- GORRAY, K.C., BASKIN, D., FUJIMOTO, W.Y. Cytotoxic effects of alloxan treatment in vitro on monolayer cultures of neonatal rat pancreas. **American Journal of Physiology**, v. 245, p.E417-E423, 1983.
- GORRAY, K.C., BASKIN, D., FUJIMOTO, W.Y. Physiological and morphological changes in islet B cells following treatment of the guinea pig with alloxan. **Diabetes Research**, v.3, p.187-191, 1986 b.
- GORRAY, K.C., BASKIN, D.G., BRODSKY, J., FUJIMOTO, W.Y. Responses of pancreatic B cells to alloxan and streptozotocin in the guinea pig. **Pancreas**, v.1, n.2, p.130-138, 1986a.
- GOUGH, C., GALERA, C., VASSE, J., WEBSTER, G., COCKING, E.C., DÉNARIÉ, J. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.10, n.5, p.560-570, 1997.

- GRAY, A.M., FLATT, P.R. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). **British Journal of Nutrition**, v.81, p.203-209, 1999.
- GRIFFITHS, L.A., BARROW, A. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats, **The Journal of Biochemistry**, v.130, p.1161-1162, 1972.
- GROSMAN, N. Influence of probes for calcium-calmodulin and protein kinase C signalling on the plasma membrane Ca⁺⁺-ATPase activity of rat synaptosomes and leukocyte membranes. **Immunopharmacology**, v.40, p.163-171, 1998.
- GUPTA, S., RIFICI, V., CROWLEY, S., BROWNLEE, M., SHAN, Z., SCHLONDORFF, D. Interactions of LDL and modified LDL with mesangial cells and matrix. **Kidney International**, v.41, n.5, p.1161-1169, 1992 b.
- GUPTA, S., SUSSMAN, I., MCARTHUR, C.S., TORNHEIM, K., COHEN, R.A., RUDERMAN, N.B. Endothelium-dependent inhibition of Na(+)-K+ ATPase activity in rabbit aorta by hyperglycemia. Possible role of endothelium-derived nitric oxide. **Journal of Clinical Investigation**, v.90, n.3, p.727-732, 1992 a.
- GUPTA, S., YANG, S., COHEN, R. A., KRANE, R. J., SAENZ-DE-TEJADA, I. Altered contractility of urinary bladder in diabetic rabbits: relationship to reduced Na+ pump activity. **American Journal of Physiology**, v.271, n. 6, Pte.1, p.C2045-C2052, 1996.
- HA, T., LEAN, M.E.J. Recommendations for the nutritional management of patients with diabetes mellitus. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.52, n.7, p.467-481, 1998.
- HADOUR, G., FERRERA, R., SEBBAG, L., FORRAT, R., DELAYE, J., DE-LORGERIL, M. Improved myocardial tolerance to ischaemia in the diabetic rabbit. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.30, n.9, p.1869-1875, 1998.
- HÄMÄLÄINEN, M.M., MÄKINEN, K.K. Metabolism of glucose, fructose and xylitol in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Nutrition**, v.112, p.1369-1378, 1982.
- HARBORNE, J.B. Plant polyphenols. 6. The flavonol glycosides of wild and cultivated potatoes. **The Journal of Biochemistry**, v.84, p.100-106, 1962.
- HATCHELL, D.L., REISER, H.J., BRESNAHAN, J.F., WHITWORTH, U.G. Resistance of cats to the diabetogenic effect of alloxan. **Laboratory Animal Science**, v.36, n.1, p.37-40, 1986.
- HATTON, M. W., SOUTHWARD, S. M., ROSS, OUELLET, B., RICHARDSON, M., WINOCOUR, P.D. Comparative metabolism of plasminogen glycoforms I and II in the alloxan-diabetic rabbit. **American Journal of Physiology**, v.269, n.6, Pte.1, p.E1017-E1023, 1995.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v.32, n.7, p.1141-1148, 1983.
- HEINEMANN, L. et al. Intensificador de absorção poderia facilitar o uso da insulina via nasal. **Diabetes Clínica**, v.4, n.5, p.333, 2000 a.
- HEINEMANN, L., KRAMER, U., KLOTZER, H.M., HERMANN, M. Monitoramento de glicose com sensores óticos. **Diabetes Clínica**, v.4, n.2, p.85-86, 2000 b.
- HERSE, P., ADAMS, L. Effect of hyperglycemia duration on rabbit corneal thickness and endothelial ATPase activity. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.73, n.2, p.158-161, 1995.

- HERTOG, M.G.L., KROMHOUT, D., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., FIDANZA, F., GIAMPAOLI, S., JANSEN, A., MENOTTI, A., NEDELJKOVIC, S., PEKKARINEN, M., SIMIC, B.S., TOSHIMA, H., FESKENS, E.J.M., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. **Archives of Internal Medicine**, v.155, n.4, p.381-386, 1995.
- HIROTA, S., SHIMODA, T., TAKAHAMA, U. Tissue and spatial distribution of flavonol and peroxidase in onion bulbs and stability of flavonol glucosides during boiling of the scales. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v.46, p.3497-3502, 1998.
- HOLLANDER, P. Os efeitos diferenciais da nateglinida e sulfoniluréias nos níveis de glicose e secreção de insulina no período de refeição. **Diabetes Clínica**, v.4, n,1, p.27-28, 2000.
- HOLLENBECK, C.B., COULSTON, A.M., REAVEN, G.M. To what extent does increased dietary fiber improve glucose and lipid metabolism in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.43, p.16-24, 1986.
- HOSNY, E.A., GHILZAI, N.M.K., ELMAZAR, M.M. Promotion of oral insulin absorption in diabetic rabbits using pH-dependent coated capsules containing sodium cholate. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.72, p.203-207, 1997.
- HU, S., WANG, S., FANELLI, B., BELL, P.A., DUNNING, B.E., GEISSE, S., SCHMITZ, R., BOETTCHER, B.R. Pancreatic-cell K(ATP) channel activity and membrane-binding studies with nateglinide: a comparison with sulfonylureas and repaglinide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.293, n.2, p.444-452, 2000. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- HUANG, H.C., WENG, Y.I., LEE, C.R., JAN, T.R., CHEN, Y.L., LEE, Y.T. Protection by scoparone against the alterations of plasma lipoproteins, vascular morphology and vascular reactivity in hyperlipidaemic diabetic rabbit. **British Journal Pharmacology**, v.110, n.4, p.1508-1514, 1993.
- HUYNH, H., FELDT, L.S. Conditions under which mean square ratios in repeated measurements designs have exact F-Distributions. **Journal of American Statistical Association**, v. 65, p.1582-1589, 1970.
- IIZUKA, A., IJIMA, O.T., YOSHIE, F., MAKINO, B., AMAGAYA, S., KOMATSU, Y., KONDO, K., MATSUMOTO, A., ITAKURA, H. Inhibitory effects of Dai-saiko-to (Da-Chai-Hu-Tang) on the progression of atherosclerotic lesions in Kurosawa and kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.63, p.209-218, 1998.
- IKEDA, T., FUJIYAMA, K. The effect of pioglitazone on glucose metabolism and insulin uptake in the perfused liver and hindquarter of high-fructose-fed-rats. **Metabolism**, v.47, n.9, p.1152-1155, 1998.
- IVORRA, M.D., PAYÁ, M., VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p.243-275, 1989.
- IYER, U.M., MEHTA, N.C., MANI, I., MANI, U.V. Studies on the effect of dry Sundakai (*Solanum torvum*) powder supplementation on lipid prolife, glycated proteins and amino acids in non-insulin dependent diabetic patients. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.42, p.175-182, 1992.
- JAIN, S.K. Hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.35, p.21340-21345, 1989.

- JANJIC, D., MAECHLER, P., SEKINE, N., BARTLEY, C., ANNEN, A.S., WOLLHEIM, C.B. Free radical modulation of insulin release in INS-1 cells exposed to alloxan. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.639-648, 1999.
- JEAN, T., BODINIER, M. C. Mediators Involved in Inflammation: effects of Daflon 500 mg on Their Release. **Angiology**, v.45, n.6, Pte. 2, p.554-559, 1994.
- JENKINS, K.J., ATWAL, A .S. Flavonoids increase tissue essential fatty acids in vitamin E-deficient chicks. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, v.6, n.2, p.97-103, 1995.
- JONAS, J. C., PLANT, T. D., GILON, P., DETIMARY, P., NENQUIN, M., HENQUIN, J.C. Multiple effects and stimulation of insulin secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. **British Journal of Pharmacology**, v.114, n.4, p.872-880, 1995. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- KAHN, C. R. Section on cellular and Molecular physiology. **Joslin Diabetes Center Research Report** 1997-98, v.11, n. 3., p.17, 1998.
- KARAGEUZYAN, K.G., VARTANYAN, G.S., AGADJANOV, M.I., PANOSSIAN, A.G., HOULT, R.S. Restoration of the disordered glucose-fatty acid cycle in alloxan-diabetic rats by trihydroxyoctadecadienoic acids from *Bryonia alba*, a native armenian medicinal plant. **Planta Medica**, v.64, p.417-422, 1998.
- KEMNITZ, J.W., ELSON, D.F., ROECKER, E.B., BAUM, S.T., BERGMAN, R.N., MEGLASSON, M.D. Pioglitazone increases insulin sensitivity, reduces blood glucose, insulin, and lipid levels, and lowers blood pressure in obese, insulin-resistant rhesus monkeys. **Diabetes**, v.43, n.2, p.204-211, 1994. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- KIM, H.R., RHO, H.W., PARK, B.H., PARK, J.W., KIM, J.S., KIM, U.H., CHUNG, M.Y. Role of Ca^{2+} in alloxan-induced pancreatic β -cell damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1227, p.87-91, 1994.
- KINOSHITA, J. H., MEROLA, L. O., SATOH, K., DIKMAK, E. Osmotic changes caused by the accumulation of dulcitol in the lenses of rats fed with galactose. **Nature**, v. 194, p.1085-1087, 1962.
- KLAPPOTH, W. et al. Variabilidade entre os indivíduos do efeito metabólico da insulina inalável e impacto de um intensificador de absorção. **Diabetes Clínica**, v.4, n.1, p.24-25, 2000.
- KUBISCH, H.M., WANG, J., BRAY, T.M., PHILLIPS, J.P. Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic β -cells against oxidative stress. **Diabetes**, v.46, p.1563-1566, 1997.
- KUROWSKA, E.M., BORRADAILE, N., MEADE, M., SPENCE, J.D., CARROLL, K.K. Cholesterol-lowering effects of dietary citrus juices and their flavonoids. Studies in rats, mice and rabbits. **Atherosclerosis**, v.134, n.1-2, p.330, 1997.
- KWITEROVICH Jr., P.O. The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. **Journal of The American Dietetic Association**, v.97, n.7, p.s31-s41, 1997. (Suppl.).
- LAKSHMI, K.B., VIMALA, V. Hypoglycemic effect of selected sorghum recipes. **Nutrition Research**, v.16, n.10, p.1651-1658, 1996.
- LAMELA, M., CADAVID, I., CALLEJA, J.M. Effects of *Lythrum salicaria* extracts on hyperglycemic rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.15, p.153-160, 1986.
- LANG, C. M., MUNGER, B. L., RAPP, F. The guinea pig as an animal model of diabetes mellitus. **Laboratory Animal Science**, v.27, n.5, Pte.2, p. 789-805, 1977.

- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1985. 723p.
- LENZEN, S. MUNDAY, R. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan its reduction products and its N-metil derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology**, v.42, n.7, p.1385-1391, 1991.
- LI, C., HOMMA, M., OKA, K. Characteristics of delayed excretion of flavonoids in human urine after administration of Shosaiko-to, a herbal medicine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.21, n.12, p.1251-1257, 1998.
- LIMA, A. O. **Métodos de Laboratório aplicados à Ciência**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 549p.
- LIN, W.J., ANDERSON, J.W. Effects of high sucrose or starch-bran diets on glucose and lipid metabolism of normal and diabetic rats. **Journal of Nutrition**, v.107, n.4, p.584-595, 1977.
- LOMBARDO, Y.B., CHICCO, A., D'ALESSANDRO, M.E., MARTINELLI, M., SORIA, A., GUTMAN, R. Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1299, p.175-182, 1996.
- LONNROT, M., SALMINEN, K., KNIP, M., SAVOLA, K., KULMALA, P., LEINIKKI, P., HYYPIA, T., AKERBLUM, H.K., HYOTY, H. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. **Journal of Medical Virology**, v.61, n.2, p.214-220, 2000. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- MACHO, L., FICKOVA, M., SEBOKOVA, E., MITKOVA, A., KLIMES, I. Effect of dietary fish oil on 2-deoxy-D-3H glucose uptake in isolated adipocytes of rats fed various diets. **Annals New York Academy of Sciences**, v.683, p.237-243, 1993.
- MADAR, Z. Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) as a means of reducing postprandial glucose level in diabetic rats. **Nutrition Reports International**, v.29, n.6, p.1267-1273, 1984.
- MADAR, Z. Metabolic consequences of the alpha-glucosidase inhibitor BAY-M-1099 given to nondiabetic and diabetic rats fed a high-carbohydrate diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.49, n.1, p.106-111, 1989.
- MANACH, C., REGERAT, F., TEXIER, O., AGULLO, G., DEMIGNE, C., REMESY, C. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. **Nutrition Research**, v.16, n.3, p.517-544, 1996.
- MARCIANO, C. **Efeito de amido da fruta da lobeira no controle de diabetes mellitus**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MARRIF, H.I., ALI, B.H., HASSAN, K.M. Some pharmacological studies on *Artemisia herba-alba* (Asso.) in rabbits and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, p.51-55, 1995.
- MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 2. ed. São Paulo: Guanabara, 1999. 360p.
- MATTHEWS, D. O que exigimos de uma nova medicação para o tratamento do diabetes?. **Diabetes Clínica**, v.3, n.5, p.262-263, 1999.
- MAZUR, W.M., DUKE, J.A., WÄHAKÄ, K., RASKU, S., ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.9, p.193-200, 1998.

- McANLIS, G.T., MCENENY, J., PEARCE, J., YOUNG, I.S. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.52, n.3, p.202-206, 1998.
- McDOWELL, T. S., CHAPLEAU, M. W., HAJDUCZOK, G., ABOUD, F. M Baroreflex dysfunction in diabetes mellitus: I. Selective impairment of parasympathetic control of heart rate. **American Journal of Physiology**, v.266, n.1, Pte.2, p. H235-H243, 1994.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism and its selective modification. **The Journal of Biological Chemistry**, v.263, n.33, p.17205-17208, 1988.
- MELLO, M. A., LUCIANO, E. Effects of protein malnutrition on glucose tolerance in rats with alloxan-induced diabetes. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.28, n.4, p. 467-470, 1995.
- MILLER, O. **Laboratório para o clínico**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1986. 549p.
- MINNICH, A., ZILVERSMIT, D.B. Impaired triacylglycerol catabolism in hypertriglyceridemia of the diabetic, cholesterol-fed rabbit: a possible mechanism for protection from atherosclerosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.26, n.1002, Pte.3, p.324-332, 1989.
- MISHKINSKY, J.S., GOLDSCHMIED, A., JOSEPH, B., AHRONSON, Z., SULMAN, F.G. Hypoglycaemic effect of *Trigonella Foenum* and *Graecum Lupinus Termis* (Leguminosae) seeds and their major alkaloids in alloxan-diabetic and normal rats. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.210, p.27-37, 1974.
- MIYAKE, T., SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of natural compounds found in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.5, p.1819-1822, 1997.
- MIYAKE, Y., YAMAMOTO, K., TSUJIHARA, N., OSAWA, T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. **Lipids**, v.33, n.7, p.689-695, 1998.
- MOLONEY, P. J., COVAL, M. Antigenicity of insulin: diabetes induced by specific antibodies. **The Journal of Biochemistry**, v.59, p.179-185, 1955.
- MORIMITSU, Y., YOSHIDA, K., ESAKI, S., HIROTA, A. Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.59, n.11, p.2018-2021, 1995.
- MOSSBERG, K. A., TAEGTMEYER, H. Dihydroergotamine as pharmacologic euglycemic clamp in surgically traumatized rabbit. **metabolism**, v.40, n.6, p.594-599, 1991.
- MURTIASHAW, M., BAYNES, J.W., THORPE, S.R. Albumin catabolism in diabetic rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.225, n.1, p.256-262, 1983.
- NAKAGAWA, K., OKUDA, S., MIYAZAWA, T. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin, into human plasma. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.12, p.1981-1985, 1997.
- NECHIFOR, M., FILIP, C., TESLARIU, E., NEUGHEBAUER, B. I., COSTULEANU, M., NEGRU, A. Influence of clonidine on alloxan-induced diabetes in rats. **Annals New York Academy Sciences**, v.12, n.763, p. 377-379, 1995.
- OHNO, T., NAMIKAWA, T. Development of a laboratory colony of the musk shrew (*Suncus murinus*, Insectivora) exhibiting a high incidence of spontaneous diabetes mellitus. **Laboratory Animal Science**, v.46, n.1, p.107-108, 1996.

- OKADA, Y., MIYAUCHI, N., SUZUKI, K., KOBAYASHI, T., TSUTSUI, C., MAYUZUMI, K., NISHIBE, S., OKUYAMA, T. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.43, n.8, p.1385-1387, 1995.
- OLIVEIRA, A.E.A., AZEVEDO, C.R., VENÂNCIO, T.M., MACHADO, O.L.T., XAVIER-FILHO, J. A presença de insulina em plantas: função biológica e possível de sua utilização no tratamento do diabetes. **Diabetes Clínica**, v.4, n.4, p.283-290, 2000.
- OLIVEIRA, R.F. Avaliações das associações das insulinas N e R humanas + Lispro (H) na terapia de diabéticos tipo 1. **Diabetes Clínica**, v.3, n.3, p.140-145, 1999.
- OLIVEIRA, T.T., NAGEN, T.J., MIRANDA, L.C.G., PAULA, V.F., TEIXEIRA, M.A. Inhibitory action on aldose reductase by soybean flavonoids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.8, n.3, p.211-213, 1997.
- OLIVEROS, L., GIMENEZ, I., GIMENEZ, M.S. Effect of sucrose feeding during pregnancy on rat maternal and fetal liver lipid and glycogen metabolism. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n.3, p.412-416, 1995.
- ONUNKWO, G.C., AKAH, P. A., UDEALA, O. K. Studies on *Bridelia ferruginea* leaves. Stability and hypoglycaemic actions of leaf extract tablets. **Phytotherapy Research**, v.10, p. 418-420, 1996.
- PAGANO, P.J., GRISWOLD, M.C., RAVEL, D., COHEN, R.A. Vascular action of the hypoglycaemic agent gliclazide in diabetic rabbits. **Diabetologia**, v. 41, n.1, p. 9-15, 1998.
- PAGLIASSOTTI, M.J., PRACH, P.A. Quantity of sucrose alters the tissue pattern and time course of insulin resistance in young rats. **American Journal of Physiology**, v. 269, n.3, Pte.2, p.R641-R646, 1995.
- PALUMBO, P.J. Metformin: effects on cardiovascular risk factors in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of diabetes and its complications**, v.12, n.2, p.110-119, 1998.
- PARK, B. H., RHO, H. W., PARK, J. W., CHO, C. G., KIM, J. S., CHUNG, H. T., KIM, H. R. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.5, n.210, Pte.1, p.1-6, 1995.
- PARK, J.B. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.260, p.568-574, 1999.
- PARKS, W. C., DRAKE, R. L. Insulin mediates the stimulation of pyruvate kinase by a dual mechanism. **The Journal of Biochemistry**, v.208, p.333-337, 1982.
- PEMBERTON, J. B., MANAX, W. G. Problems in producing alloxan diabetes. **Surgery**, v.68, n.2, p.375-378, 1970.
- PENG, H.W., CHENG, F.C., HUANG, Y.T., CHEN, C.F., TSAI, T.H. Determination of naringenin and its glucuronide conjugate in rat plasma and brain tissue by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B, Biomedical Sci-Applications**, v. 714, n.2, p. 369-374, 1998.
- PENG, Y., MELIZA, L. L., VAVICH, M. G., KEMMERER, A. R. Effects of amino acid imbalance and protein content of diets on food intake and preference of young, adult, and diabetic rats. **Journal of Nutrition**, v.105, p.1395-1404, 1975.

- PESSOTTO, P., LIBERATI, R., PETRELLA, O., ROMANELLI, L., CALVANI, M., PELUSO, G. In experimental diabetes the decrease in the eye of lens carnitine levels is an early important and selective event. **Experimental Eye Research**, v.64, n.2, p.195-201, 1997.
- PETERSON, J., DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.
- PETIT, P., SAUVAIRE, Y., HILLAIRES-BUYS, D., MANTEGHETTI, M., BAISSAC, Y., GROSS, R., RIBES, G. Insulin stimulating effect of an original amino acid, 4-hydroxyisoleucine, purified from fenugreek seeds. **Diabetologia**, v.38, p.101, 1995. (Suppl. 1).
- PODOLIN, D.A., GAYLES, E.C., WEI, Y., THRESHER, J.S., PAGLIASSOTTI, M.J. Menhaden oil prevents but does not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. **American Journal of Physiology**, v.274, n.3, Pte.2, p.R840-R848, 1998.
- PRICE, K.R., RHODES, M.J.C. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. **Journal Science Food Agricultural**, v.74, p.331-339, 1997.
- PUGAZHENTHI, S., ANGEL, J.F., KHANDELWAL, R.L. Effects of high sucrose diet on insulin-like effects of vanadate in diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.122, p.77-84, 1993 b.
- PUGAZHENTHI, S., ANGEL, J.F., KHANDELWAL, R.L. Effects of vanadate administration on the high sucrose diet-induced aberrations in normal rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.122, p.69-75, 1993 a.
- RAGHURAM, T.C., SHARMA, R.D., SIVAKUMAR, B. Effect of Fenugreek seeds on intravenous glucose disposition in non-insulin dependent diabetic patients. **Phytotherapy Research**, v.8, p.83-86, 1994.
- RAHMAN, A.U., ZAMAN, K. Medicinal plants with hypoglycemic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.26, p.1-55, 1989.
- REEVES, P.G., NILSEN, F.H., FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- RHODES, M.J.C. Physiologically-active compounds in plant foods: an overview. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.55, p.371-384, 1996.
- RICHARDSON, M., HADCOCK, S.J., HATTON, B.D., WINOCOUR, P.D., HATTON, M.W. Proteoglycan alterations in the aortic intima-media of alloxan-diabetic rabbits: an ultrastructural and biochemical study. **Experimental and Molecular Pathology**, v.62, n.3, p.145-159, 1995.
- RITTER, S., WEATHERFORD, S. C., STONE, S. L. Glucagon-induced inhibition of feeding is impaired by hepatic portal alloxan injection. **American Journal of Physiology**, v.250, p. R682-R690, 1986.
- ROBAK, J., GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v.37, n.5, p.837-841, 1988.
- ROSSINI, A.A., LIKE, A.A., CHICK, W.L., APPEL, M.C. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. **Proceedings of the National Academy Science United State of American**, v.74, n.6, p.2485-2489, 1977.

- SÁ, R.D.D.E., VIREQUE, A.A., REIS, J.E.D., GUERRA, M.D. Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1-2, p.283-287, 2000. (Abstract) (webof.science.fapesp.br).
- SALZMAN, A., MURPHY, K.J., BEECHAM, S.K. Resumos de trabalhos e congressos. Rosoglitazona: segurança cardíaca com tratamento a longo prazo em pacientes portadores de diabetes tipo 2. **Diabetes Clínica**, v.4, n.6, p.427, 2000.
- SÁNCHEZ DE ROJAS, V.R., SOMOZA, B., ORTEGA, T., VILLAR, A.M. Isolation of vasodilatory active flavonoids from the traditional remedy *Satureja obovata*. **Planta Medica**, v.62, p.272-274, 1996.
- SASKIA, A.B.E., ACKER, V., BALEN, G.P.V., BERG, D.J.V.D., BAST, A.V., VIJGH, W.J.F.V.D. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v.56, p. 935-943, 1998.
- SATO, J., INAMURA, T., NISHIMURA, H., SHIRABE, S., KANAZAWA, M., NOTOYA, Y., HAYASHI, T., ITO, H. Effects of pioglitazone on serum lipids and atherosclerosis in rabbits with hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.115, p.S28, 1995.
- SATO, S., MORI, K., WYMAN, M., KADOR, P.F. Dose-dependent prevention of sugar cataracts in galactose-fed dogs by the aldose reductase inhibitor M79175. **Experimental Eye Research**, v.66, p.217-222, 1998.
- SCHRAMM, D.D., GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.9, p.560-566, 1998.
- SCHRAMM, D.D., PEARSON, D.A., GERMAN, J.B. Endothelial cell basal PGI₂ release is stimulated by wine in vitro: one mechanism that may mediate the vasoprotective effects of wine. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.8, n.11, p.647-651, 1997.
- SEBOKOVA, E., KLIMES, I., MOSS, R., STOLBA, P., WIERSMA, M.M., MITKOVA, A. Muscle GLUT 4 protein levels and impaired triglyceride metabolism in streptozotocin diabetic rats. Effect of a high sucrose diet and fish oil supplementation. **Annals New York Academy of Sciences**, v.683, p.218-227, 1993 a.
- SEBOKOVA, E., KLIMES, I., HERMANN, M., MINCHENKO, A., MITKOVA, A., HROMADOVA, M. Modulation of the hypolipidemic effect of fish oil by inhibition of adipose tissue lipolysis with acipimox, a nicotinic acid analog. **Annals New York Academy of Sciences**, v.683, p.183-191, 1993 b.
- SHARMA, R.D. Effect of fenugreek seeds and leaves on blood glucose and serum insulin responses in human subjects. **Nutrition Research**, v.6, p.1353-1364, 1986.
- SHARMA, R.D., RAGHURAM, M.D. Hypoglycaemic effect of fenugreek seeds in non-insulin dependent diabetic subjects. **Nutrition Research**, v.10, p.731-739, 1990.
- SHIMABUKURO, M., ZHOU, Y.T., LEVI, M., UNGER, R.H. Fatty acid-induced β cell apoptosis: link between obesity and diabetes. **Proceedings of the National Academy Science United State of American**, v.95, p.2498-2502, 1998.
- SHIMOI, K., OKADA, H., FURUGORI, M., GODA, T., TAKASE, S., SUZUKI, M., HARA, Y., YAMAMOTO, H., KINAE, N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. **FEBS Letters**, v.438, p.220-224, 1998.
- SHINKAI, H. Recent developments in oral hypoglycemic agents. **Drug Discovery Today**, v.4, n.6, p.283-288, 1999.

- SHISHERA, A., SHECHTER, Y. Mechanism of pervanadate stimulation and potentiation of insulin activated glucose transport in rat adipocytes: dissociation from vanadate effect. **Endocrinology**, v.133, n.4, p.1562-1568, 1993. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- SILVA, M.B., MENDEZ, M.H.M., DERIVI, S.C.N. Efeito hipoglicêmico de alimentos ricos em fibra solúvel. Estudo com jiló (*Solanum gilo*, Raddi). **Alimentos e Nutrição**, v.9, p.53-64, 1998.
- SLONIM, A.E., SURBER, M.L., PAGE, D.L., SHARP, R.A., BURR, I.M. Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. **Journal of Clinical Investigation**, v.71, p.1282-1288, 1983.
- SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R. et al. **Principles of biochemistry**: mammalin. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 612p.
- SOARES, J.C.M., COSTA, S.T., CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com *Diabetes mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium jambolanum*. **Ciência Rural**, v.30, n.1, p.113-118, 2000.
- SORENSEN, R. L., BRELJE, T. C., ROTH, C. Effect of tyrosine kinase inhibitors on islet of Langerhans: evidence for tyrosine kinases in the regulation of insulin secretion. **Endocrinology**, v.134, n.4, p.1975-1978, 1994.
- SORIA, A, CHICCO, A., MOCCHIUTTI, N., GUTMAN, R.A., LOMBARDO, Y.B., MARTIN-HIDALGO, A., HERRERA, E. A sucrose-rich diet affects triglyceride metabolism differently in pregnant and nonpregnant rats and has negative effects on fetal growth. **Journal of Nutrition**, v.126, n.10, p.2481-2486, 1996.
- SOTO, C. P., PEREZ, B. L., FAVARI, L. P., REYES, J. L. Prevention of alloxan-induced diabetes mellitus in the rat by silymarin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.119C, n.2, p.125-129, 1998.
- SPADELLA, C. T., MERCADANTE, M. C. S., SCHELLINI, S. A., MACHADO, J. L. M., OLIVEIRA, W. K., BACCHI, C. E. Effect of pancreas transplantation on the prevention of nephropathy in alloxan-induced diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29. p.1019-1024, 1996.
- STATSOFT, Inc. **STATISTICA for windows** [computer program manual]. Tulsa, ok: Statsoft, Inc., 2000. <http://www.statsoft.com>
- SUBRAMANIAM, S. The emerging role of thiazolidinediones in the treatment of diabetes-mellitus and related disorders. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.21, n.1-2, p.121-136, 1999. (Abstract) (www.sciencedirect.com).
- SUBRAMONIAM, A., PUSHPANGADAN, P., RAJASEAKHARAN, S., EVANS, D.A., LATHA, P.G., VALSARAJ, R. Effects of *artemisia pallens* Wall. on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.50, p.13-17, 1996.
- SUNAGA, Y., INAGAKI, N., GONOI, T., YAMADA, Y., ISHIDA, H., SEINO, Y., SEINO, S. Troglitazone but not pioglitazone affects ATP-sensitive K⁺ channel activity. **European Journal of Pharmacology**, v.381, p.71-76, 1999.
- SUNDARAM, R., VENKATARANGANNA, M.V., GOPUMADHAVAN, S., MITRA, S.K. Interaction of a herbomineral preparation D-400, with oral hypoglycaemic drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, p.55-61, 1996.
- TAHA, S.A. Effect of ambrein on blood glucose levels of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, p.145-148, 1991.

- TAKASU, N., ASAWA, T., KOMIYA, I., NAGASAWA, Y., YAMADA, T. Alloxan-induced DNA strand breaks in pancreatic islets. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.4, p.2112-2114, 1991.
- TESFAMARIAM, B., GUPTA, S., OATES, P. J., RUDERMAN, N. B., COHEN, R. A. Reduced Na(+)-K+ pump activity in diabetic rabbit carotid artery: reversal by aldose reductase inhibition. **American Journal of Physiology**, v.265, n.4, Pte.2, p.H1189-H1194, 1993.
- THORBURN, A.W., BRAND, J.C., O'DEA, K., SPARGO, R.M., TRUSWELL, A.S. Plasma glucose and insulin responses to starch foods in australian aborigines: a population now at high risk of diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.46, p.282-285, 1987.
- TILTON, R. G., DAUGHERTY, A., SUTERA, S. P., LARSON, K. B., LAND, M. P., RATERI, D. L., KILO, C., WILLIAMSON, J. R. Myocyte contracture, vascular resistance, and vascular permeability after global ischemia in isolated hearts from alloxan-induced diabetic rabbits. **Diabetes**, v.38, n.11, p.1484-1491, 1989.
- TOPPING, D.L., OAKENFULL, D., TRIMBLE, R.P., ILLMAN, R.J. A viscous fibre (methylcellulose) lowers blood glucose and plasma triacylglycerols and increases liver glycogen independently of volatile fatty acid production in the rat. **British Journal of Nutrition**, v.58, p.21-30, 1988.
- VADLAMUDI, S., HIREMAGALUR, B.K., TAO, L., KALHAN, S.C., KALARIA, R.N., KAUNG, H.L., PATEL, M.S. Long-term effects on pancreatic function of feeding a HC formula to rats during the preweaning period. **American Journal of Physiology**, v.265, n.4, Pte.1, p.E565-E571, 1993.
- VALENSI, P.E., BEHAR, A., CHAMPVALLINS, M.M., ATTALAH, A., BOULAKIA, F.C., ATTALI, J.R. Effects of purified micronized flavonoid fraction on capillary filtration in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, v.13, p.882-888, 1996.
- VAN ASSCHE, F. A., AERTS, L., GEPTS, W. Morphological changes in the endocrine pancreas in pregnant rats with experimental diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 80, p.175-170, 1979.
- VANDERBILT, J.N., BLOOM, K.S., ANDERSON, J.N. Endogenous nuclease. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.21, p.13009-13017, 1982.
- VARMA, S. D, HAMED, K. E. A., RICHARD, D. R. Refractive change in alloxan diabetic rabbits control by flavonoids I. **Acta Ophthalmologica**, v.58, p.748-759, 1980.
- VARMA, S. D. Inhibition of aldose reductase by flavonoids: possible attenuation of diabetic complications. **Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships**, p.343-358, 1986.
- VARMA, S. D., MIKUNI, I., KINOSHITA, J. H. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. **Science**, v.188, p.1215-1216, 1975.
- VARMA, S. D., MIZUNO, A. , KINOSHITA, J. H. Diabetic cataracts and flavonoids. **Science**, v.195, p.205-206, 1977.
- VELIOGLU, Y.S., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4113-4117, 1998.
- VERTOMMEN, J., ENDEN, M. V. D., SIMOENS, L., LEEUW, I. Flavonoid [diosmin] treatment reduces glycation [of proteins] and lipid peroxidation in experimental diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.8, n.7, p.430-432, 1994.

- VINSON, J. A., HU, S., JUNG, S., STANSKI, A. M. A citrus extract plus ascorbic acid decreases lipids, lipid peroxides, lipoprotein oxidative susceptibility, and atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.4, p.1453-1459, 1998 b.
- VINSON, J.A., HAO, Y., SU, X., ZUBIK, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3630-3634, 1998a.
- VISKARI, H.R., KOSKELA, P., LONNROT, M., LUONUANSUU, S., REUNANEN, A., BAER, M., HYOTY, H. Seriam as infecções por enterovírus a causa do aumento da incidência do diabetes tipo 1? **Diabetes Clínica**, v.4, n.3, p.162-164, 2000.
- VON HERRATH, V.M.G., ALLISON, J., MILLER, J.F.A.P., OLDSTONE, M.B.A. Focal expression of interleukin-2 does not break unresponsiveness to "self" (viral) antigen expressed in β cells but enhances development of autoimmune disease (Diabetes) after initiation of an anti-self immune response. **Journal of Clinical Investigation**, v.95, p.477-485, 1995.
- VOS, D.A., HEIMBERG, H., QUARTIER, E., HUYPENS, P., BOUWENS, L., PIPELEERS, D., SCHUIT, F. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. **Journal of Clinical Investigation**, v.96, n.5, p.2489-2495, 1995.
- WEBSTER, G., JAIN, V., DAVEY, M.R., GOUGH, C., VASSE, J., DÉNARIÉ, J., COCKING, E.C. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant, Cell and Environment**, v.21, p.373-383, 1998.
- WHALEN, M.D., MABRY, T.J. New 8-hydroxyflavonoids from *Solanum* section *Androceras*. **Phytochemistry**, v.18, p.263-265, 1979.
- WHITE, M., KAHN, R. The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269, n.1, p.1-4, 1994.
- WILKINS, E., ATANASOV, P. Glucose monitoring: state of the art and future possibilities. **Medical Engineering & Physics**, v.18, n.4, p.273-288, 1996.
- WITMER, M.R., HADCOCK, S.J., PELTIER, S.L., WINOCOUR, P.D., RICHARDSON, M., HATTON, M.W.C. Altered levels of antithrombin III and fibrinogen in the aortic wall of the alloxan-induced diabetic rabbit: evidence of a prothrombotic state. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.119, p.221-230, 1992.
- WOLFF, S.P., DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification. **The Journal of Biochemistry**, v.245, p.243-250, 1987.
- WOLFFENBUTTEL, B.H.R. Repaglinide – a new compound for the treatment of patients with type 2 diabetes. **The Netherlands Journal of Medicine**, v.55, p.229-234, 1999.
- WOLLENWEBER, E., DIETZ, V.H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, v.20, n.5, p.869-932, 1981.
- WRIGHT, D.W., HANSEN, R.I., MONDON, C.E., REAVEN, G.M. Sucrose-induced insulin resistance in the rat: modulation by exercise and diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.38, n.6, p.879-883, 1983.
- WU, G., FLYNN, N.E. The activation of the arginine-citruline cycle in macrophages from the spontaneously diabetic BB rat. **The Journal of Biochemistry**, v.294, p.113-118, 1993.
- XU, X., WANG, H.J., MURPHY, P.A., COOK, L., HENDRICH, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. **Journal of Nutrition**, v.124, p.824-832, 1994.

- YAMANOUCHI, T., MOROMIZATO, H., KOJIMA, S., SHINOHARA, T., SEKINO, N., MINODA, S., MIYASHITA, H., AKAOKA, I. Prevention of diabetes by thymic hormone in alloxan-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, v.257, p.39-46, 1994.
- YASUDA, T., OHSAWA, K. Urinary metabolites of Daidzin orally administered in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.21, n.9, p.953-957, 1998.
- YOUNG, J. K., DIXIT, P. K. Lack of diabetogenic effect of alloxan in protein-calorie malnourished rats. **Journal of Nutrition**, v.110, p. 703-709, 1980.
- ZARZUELO, A., JIMÉNEZ, I., GÁMEZ, M.J., UTRILLA, P., FERNADEZ, I., TORRES, M.I., OSUNA, I. Effects of luteolin 5-O- β -rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v.58, n.25, p.2311-2316, 1996.
- ZENON, G. J., ABOBO, C. V., CARTER, B. L., BALL, D. W. Potencial use of aldose reductase inhibitors to prevent diabetic complications. **Clinical Pharmacy**, v.9, p. 446-457, 1990.
- ZHAO, Z. H., WATSCHINGER, B. BROWN, C. D., BEYER, M.M., FRIEDMAN, E.A. Variations of susceptibility to alloxan induced diabetes in the rabbit. **Hormone Metabolism Research**, v.19, n.11, p.534-537, 1987. (Abstract) (www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/).
- ZIYYAT, A., LEGSSYER, A. MEKHFI, H., DASSOULI, A., SERHROUCHNI, M., BENJELLOUN, W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p.45-54, 1997.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Quadro 1A – Análise de variância da regressão linear simples dos níveis sanguíneos de colesterol, triacilgliceróis e glicose em função da dose, em coelhos, avaliados 4 dias após a aplicação de aloxano (experimento 1).

FV	Colesterol ¹				Triacilgliceróis ²			Glicose ³		
	gl	SQ	QM	F	SQ	QM	F	SQ	QM	F
Regressão	1	1275,31	1275,31	0,020 ^{n.s.}	1538727,12	1538727,12	0,051 ^{n.s.}	12333,31	12333,31	0,172 ^{n.s.}
Falta de ajustamento	3	146484,37	48828,12	0,748 ^{n.s.}	36668928,88	12222976,29	0,403 ^{n.s.}	34073,93	11357,98	0,158 ^{n.s.}
Tratamentos (doses)	(4)	(147759,68)			(38207656,00)			(46407,24)		
Resíduo puro	22	1436200,48	65281,84		668084472	30367476,00		1578078,48	71730,84	
Total	26	1583960,09			706292129,756			1624485,731		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	(25)	(1582684,78)			(704753402,633)			(1612152,420)		

^{n.s.} Não significativo (P > 0,05).

¹ $y = 453,214 - 0,327x$ ($r^2 = 0,009$)

² $y = 7079,513 - 11,340x$ ($r^2 = 0,040$)

³ $y = 609,978 - 1,015x$ ($r^2 = 0,266$)

Quadro 2A – Teste de pressuposição de paralelismo¹ da análise de covariâncias¹ do peso e constituintes sangüíneos dos coelhos diabéticos em função dos tratamentos, ao final² do experimento 1

Variável	Fonte de variação	gl	QM	F	Probabilidade
Peso	Regressão ³	2	7080,504	0,141165	0,870757
	Resíduo	7	50157,55		
Colesterol	Regressão	2	72,19975	0,052954	0,948949
	Resíduo	5	1363,449		
Triacilgliceróis	Regressão	2	11880,89	2,637849	0,165157
	Resíduo	5	4504,008		
Glicose	Regressão	2	4045,575	0,163196	0,853072
	Resíduo	6	24789,74		

¹ Ho: Os coeficientes de regressão de todos os tratamentos, da variável em relação à covariável, são homogêneos (NETER et al., 1996).

Quadro 3A - Teste de homogeneidade de variância de peso e constituintes sangüíneos de coelhos diabéticos em função dos tratamentos no experimento 1

Variável	Dias após início da aplicação do flavonóide	Teste de Bartlett	gl	Probabilidade
Peso	1	3,291862	2	0,192849
	27	0,742289	2	0,689947
Colesterol	-1	0,013667	2	0,99319
	27	20,17167	2	4,18 x 10 ⁻⁵
Triacilgliceróis	-1	0,305673	2	0,858271
	27	34,33288	2	3,54 x 10 ⁻⁸
Glicose	-1	0,271488	2	0,873066
	27	1,815248	2	0,403492

Quadro 4A – Peso (g) e níveis dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina ou farinha de fruta-de-lobo no experimento 1

	Dias ¹	Testemunha normal ²	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Diabéticos + fruta-de-lobo
Peso	1	1470,0 ± 186 ³	1516,0 ± 102,3	1328,3 ± 633,9	1374,0 ± 246,0
	8	1733,8 ± 155,7	1616,0 ± 97,9	1501,7 ± 367,3	1387,0 ± 308,7
	15	1920,6 ± 154,7	1806,0 ± 167,2	1746,7 ± 505,5	1589,0 ± 429,8
	20	2048,1 ± 169,6	1823,0 ± 221,1	1723,3 ± 574,2	1559,0 ± 487,2
	27	2206,9 ± 170,0	1861,0 ± 314,0	1736,7 ± 879,5	1623,0 ± 501,3 a
Colesterol	-1	128,2 ± 31,7	424,4 ± 215,7	418,3 ± 464,9	353,1 ± 218,6
	6	81,6 ± 12,1	142,6 ± 148,0	98,0 ± 150,9	353,2 ± 321,7
	13	79,9 ± 15,6	141,7 ± 181,6	100,1 ± 137,1	135,5 ± 150,8
	20	77,4 ± 15,6	73,4 ± 27,6	96,8 ± 147,6	124,3 ± 176,1
	27	91,4 ± 22,7	83,9 ± 22,2	112,3 ± 124,8	75,7 ± 45,6
Triacilgliceróis	-1	225,9 ± 58,7	5075,6 ± 5389,5	5711,3 ± 1441	5256,3 ± 5170
	6	121,9 ± 26,6	233,7 ± 296,4	111,0 ± 87,8	1670,1 ± 2224,9
	13	86,4 ± 34,1	589,5 ± 1276,2	153,6 ± 418,0	677,6
	20	79,4 ± 15,0	155,5 ± 138,2	142,4 ± 117,8	432,5 ± 901,7
	27	82,3 ± 33,6	133,5 ± 84,3	125,9 ± 75,0	152,6 ± 319,0
Glicose	-1	127,1 ± 6,8	508,9 ± 169,3	487,7 ± 253,9	507,4 ± 134,6
	6	140,7 ± 8,2	431,0 ± 181,3	523,4 ± 372,7	480,2 ± 172,6
	13	131,0 ± 4,6	504,1 ± 366,5	439,7 ± 1902,1	574,6 ± 695,0
	20	126,8 ± 7,5	433,0 ± 304,2	355,5 ± 376,4	472,4 ± 185,1
	27	137,0 ± 5,3	461,2 ± 311,0	409,4 ± 541,0	497,6 ± 170,0
N ^o de coelhos		8	5	3	5

¹ Dias após início aplicação dos tratamentos

² Coelhos que não receberam aloxano.

³ Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

Quadro 5A – Teste t entre valores inicial e final¹ de peso e constituintes sanguíneos de coelhos no experimento 1.

Variável	Média		Diferença	s(d)	Teste t	gl	Probabilidade
	Inicial	Final					
Fruta-de-lobo							
Peso	1374	1623	249	246,8	2,26	4	0,087
Colesterol	326,6	276,3	-50,3	228,8	-0,44	3	0,69
Triacilgliceróis	4076,5	1792,9	-2283,6	1014,2	-4,5	3	0,02
Glicose	473,6	497,6	24	38,8	1,24	3	0,303
Naringenina							
Peso	1328,3	1736,7	408,4	100,2	7,06	2	0,019
Colesterol	418,3	112,3	-306	195	-2,72	2	0,113
Triacilgliceróis	5711,3	125,9	-5585,4	5798,4	-1,67	2	0,237
Glicose	487,7	409,4	-78,3	133,9	-1,01	2	0,418
Testemunha diabética							
Peso	1516	1861	345	229,4	3,36	4	0,028
Colesterol	424,4	83,9	-340,5	172,3	-4,42	4	0,012
Triacilgliceróis	5075,6	133,5	-4942,1	4298,1	-2,57	4	0,062
Albumina	508,9	461,2	-47,7	182,1	-0,59	4	0,59
Testemunha normal							
Peso	1470	2206,9	736,9	101,4	20,6	7	1,62 x 10 ⁻⁷
Colesterol	128,2	91,5	-36,7	25,6	-4,1	7	0,005
Triacilgliceróis	225,9	82,3	-143,6	58,3	-6,97	7	0,0002
Albumina	127,1	137	9,9	7,4	3,8	7	0,007

¹ Mensurada 1 e 27 dias após o início da administração do flavonóide

Quadro 6A – Análise de variância da regressão linear simples ($\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}$ Tempo) de peso em função do tempo (dias) em coelhos de 4 tratamentos (experimento 1)

Fonte de Variação	gl	Fruta-de-lobo			Testemunha diabética		
		SQ	QM	F	SQ	QM	F
Regressão	1	230482,3	230482,3	2,142 ^{n.s.}	410660,1	410660,1	16,796 ^{**}
Falta de ajustamento	3	44373,7	14791,23	0,137 ^{n.s.}	40445,9	13481,97	0,532 ^{n.s.}
Tratamentos (tempo)	(4)	(274856)			(451106)		
Resíduo puro	20	2151570	107578,5		507110	25355,5	
Total	24	2426426			958216,0		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	(23)	2195943,7			547555,9		

^{n.s.}, ^{**}: Não significativo e significativo (P < 0,01), respectivamente.

Quadro 6A– Continuação

Fonte de Variação	gl	Naringenina			gl	Testemunha normal		
		SQ	QM	F		SQ	QM	F
Regressão	1	335468,1	335468,1	5,461 [*]	1	2580111,6	2580111,6	64,141 ^{**}
Falta de ajustamento	3	80343,5	26781,17	0,436 ^{n.s.}	3	29229,6	9743,2	0,242 ^{n.s.}
Tratamentos (doses)	(4)	(415811,6)			(4)	(2609341,2)		
Resíduo puro	10	614333,3	61433,33		35	1407903	40225,8	
Total	14	1030143,3			39	4017244,4		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	13	694675,2			38	1437133,7		

^{n.s.}: Não significativo (P > 0,05); *, ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

Quadro 7A – Análise de variância da regressão linear simples ($\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta} / \text{Tempo}$) de triacilgliceróis em função do tempo (dias) em coelhos de 4 tratamentos (experimento 1)

FV	gl	Fruta-de-lobo			gl	Testemunha diabética		
		SQ	QM	F		SQ	QM	F
Regressão	1	58732900	58732900	7,554 *	1	89903500	89903500	21,416 **
Falta de ajustamento	3	7956700	2652233,3	0,341 ^{n.s.}	3	1788052	596017,3	0,142 ^{n.s.}
Tratamentos (tempo)	(4)	66689600			4	91691552	22922888	
Resíduo puro	15	116621565	7774771,0		19	79759131	4197849	
Total	19	183311000			23	171451000		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	18	124578265			22	81547183		

^{n.s.} Não significativo ($P > 0,05$) e *, ** $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente.

Quadro 7A– Continuação

FV	gl	Naringenina			gl	Testemunha normal		
		SQ	QM	F		SQ	QM	F
Regressão	1	72643700	72643700	9,726 *	1	102906,7	102906,7	56,590 **
Falta de ajustamento	3	749692	249897,3	0,033 ^{n.s.}	3	16951,98	5650,66	3,107 *
Tratamentos (doses)	(4)	73393392			4	119858,68		
Resíduo puro	9	67224582	7469398		32	58191,232	1818,476	
Total	13	140618000			36	178049,9		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	12	67974274			32	75143,212		

^{n.s.} Não significativo ($P > 0,05$) e *, ** $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente.

Quadro 8A – Análise de variância da regressão linear simples ($\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta} / \text{Tempo}$) de colesterol em função do tempo (dias) em coelhos de 3 tratamentos (experimento 1)

FV	Naringenina				Testemunha diabética				Testemunha normal			
	gl	SQ	QM	F	gl	SQ	QM	F	gl	SQ	QM	F
Regressão	1	238863,4	238863,4	24,983 **	1	378208,1	378208,1	30,506 **	1	13376,21	13376,21	21,705 **
Falta de ajustamento	3	1970,76	656,92	0,069 n.s.	3	35669,9	11889,97	0,959 n.s.	3	850,022	283,34	0,460 n.s.
Tratamentos (doses)	4	240834,16			4	413878			4	14226,232		
Resíduo puro	10	95611,86	9561,186		19	235556,11	12397,69		35	21569,46	616,2703	
Total	14	336446,0			23	649434			39	35795,63		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	13	97582,7			22	271226,01			38	22419,48		

n.s., **: Não significativo e significativo ($P < 0,01$), respectivamente.

Quadro 9A – Peso (g) e concentração dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) de coelhos testemunhas e dos que receberam naringenina (experimento 2)

	Dias ¹	Testemunha normal ²	Testemunha diabética	Diabéticos + Naringenina
Peso	-4	2350,7 ± 254,2 ³	2308,0 ± 376,7	2260,0 ± 191,7
	8	2625,0 ± 296,2	2355,0 ± 358,0	2311,0 ± 316,1
	15	2684,3 ± 279,3	2397,0 ± 315,8	2383,0 ± 365,4
	22	2812,9 ± 273,6	2500,0 ± 360,3	2379,0 ± 507,2
	29	2850,0 ± 270,5	2498,0 ± 328,0	2340,0 ± 597,0
Colesterol	-3	113,2 ± 36,9	318,4 ± 228,5	370,6 ± 286,1
	8	111,3 ± 34,5	172,7 ± 101,1	404,6 ± 508,1
	15	106,7 ± 38,5	103,6 ± 34,5	318,4 ± 406,3
	22	123,6 ± 42,8	101,6 ± 22,8	212,2 ± 176,2
	29	123,4 ± 45,0	102,0 ± 25,9	139,8 ± 76,3
Glicose	-1	131,4 ± 7,8	467,1 ± 156,1	425,9 ± 169,1
	8	138,1 ± 12,0	462,2 ± 230,4	387,7 ± 221,9
	15	129,7 ± 7,2	377,7 ± 228,9	372,4 ± 269,0
	22	135,6 ± 7,1	416,0 ± 262,8	393,9 ± 276,8
	29	137,7 ± 9,1	392,6 ± 206,2	392,5 ± 274,8
Triacilglicerol	-3	99,6 ± 22,7	2219,1 ± 3108,3	3300,4 ± 3793,4
	8	73,5 ± 23,2	196,3 ± 248,9	1785,1 ± 3088,3
	15	80,2 ± 25,7	104,9 ± 49,2	1044,1 ± 1688,8
	22	59,0 ± 18,7	103,3 ± 62,8	265,4 ± 331,4
	29	82,1 ± 26,9	98,2 ± 27,4	125,7 ± 70,6
Creatinina	-3	1,3 ± 0,1	2,0 ± 0,7	1,7 ± 0,3
	8	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,1
	15	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,1
	22	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,3 ± 0,1
	29	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,5	1,8 ± 0,1
Albumina (g.dL ¹)	-3	5,0 ± 0,4	4,8 ± ,4	4,6 ± ,6
	8	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,1 ± 0,1
	15	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,1	4,2 ± 0,2
	22	4,4 ± 0,1	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,2
	29	4,2 ± 0,1	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2
N ^o de		7	5	5

¹ Dias após o início da aplicação do flavonóide.

² Coelhos que não receberam aloxano.

³ Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

Quadro 10A – Teste t entre valores inicial e final¹ de peso e constituintes sangüíneos de coelhos no experimento 2.

Variável	Média		Diferença	s(d)	Teste T	gl	Probabilidade
	Inicial	Final					
Naringenina							
Peso	2260	2340	80	423	0,42	4	0,694
Colesterol	370,6	139,8	-230,8	178,8	-2,89	4	0,045
Glicose	425,9	392,5	-33,4	120,4	-0,62	4	0,569
Triacilgliceróis	3300,4	125,7	-3174,7	3002,5	-2,36	4	0,077
Creatinina	1,67	1,79	0,12	0,22	1,15	4	0,313
Albumina	4,63	3,99	-0,64	0,56	-2,58	4	0,061
Testemunha diabética							
Peso	2308	2498	190	268,6	1,58	4	0,189
Colesterol	318,4	102	-216,4	199,2	-2,43	4	0,072
Glicose	467,1	392,6	-74,5	49,7	-3,35	4	0,028
Triacilgliceróis	2219,1	98,2	-2120,9	2486,5	-1,91	4	0,129
Creatinina	1,98	1,89	-0,09	0,37	-0,53	4	0,622
Albumina	4,82	4,13	-0,69	0,23	-6,72	4	0,003
Testemunha normal							
Peso	2350,7	2850	499,3	92,4	14,3	6	7,3 x 10 ⁻⁶
Colesterol	113,2	123,4	10,2	47	0,58	6	0,586
Glicose	131,4	137,7	6,3	12,1	1,38	6	0,218
Triacilgliceróis	99,6	82,1	-17,5	44,6	-1,04	6	0,339
Creatinina	1,35	1,55	0,2	0,2	2,77	6	0,033
Albumina	5,04	4,19	-0,85	0,43	-5,26	6	0,002

¹ Mensurada -4 e 29 dias após o início da administração do flavonóide para o peso, -1 e 29 dias para glicose e -3 e 29 para os demais constituintes sangüíneos.

Quadro 11A – Análise de variância da regressão linear simples ($\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}$ Tempo) de colesterol em função do tempo (dias) em coelhos de 2 tratamentos (experimento 2)

Fonte de Variação	gl	Naringenina			Testemunha diabética		
		SQ	QM	F	SQ	QM	F
Regressão	1	195602,6	195602,6	2,782 ^{n.s.}	140883,0	140883,0	16,756 ^{**}
Falta de ajustamento	3	49654,56	16551,52	0,235 ^{n.s.}	35155,48	11718,49	1,394 ^{n.s.}
Tratamentos (tempo)	(4)	245257,16			176038,48		
Resíduo puro	20	1406003,2	(70300,16)		1681606	(8408,03)	
Total	24	1651260,3			344199,1		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	23	1455658,6			203316,1		

^{n.s.}, ^{**}. Não significativo e significativo (P < 0,01), respectivamente.

Quadro 12A – Análise de variância da regressão linear simples ($\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta}$ Tempo) de triacilgliceróis em função do tempo (dias) em coelhos de 2 tratamentos (experimento 2)

Fonte de Variação	gl	Naringenina			gl	Testemunha normal		
		SQ	QM	F		SQ	QM	F
Regressão	1	32348964,1	32348964,1	9,272 ^{**}	1	11159000,1	11159000,1	8,840 ^{**}
Falta de ajustamento	3	1409303,9	469767,97	0,135 ^{n.s.}	3	6403439,9	2134479,97	1,691 ^{n.s.}
Tratamentos (doses)	(4)	33758268,0			(4)	(17562440)		
Resíduo puro	20	69776140	3488807,0		20	25246660	1262333,0	
Total	24	103534409,0			24	42809097,3		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	23	71185444,9			23	31650097,3		

^{n.s.} Não significativo (P > 0,05); *, ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

Quadro 13A – Análise de variância da regressão linear simples ($\hat{Y} = \hat{\alpha} + \hat{\beta} / \text{Tempo}$) de albumina em função do tempo (dias) em coelhos de 4 tratamentos (experimento 1)

Fonte de Variação	gl	Naringenina			gl	Testemunha Normal		
		SQ	QM	F		SQ	QM	F
Regressão	1	0,968689	0,968689	15,061 **	1	1,253282	1,253282	35,423 **
Falta de ajustamento	3	0,203415	0,067805	1,054 ^{n.s.}	3	0,176918	0,05897	1,667 ^{n.s.}
Tratamentos (doses)	(4)	1,172104			(4)	1,4302		
Resíduo puro	20	1,28632	0,064316		20	0,7076	0,03538	
Total	24	2,458424			24	2,1378		
Resíduo da regressão (Resíduo + FA)	23	1,489735			23	0,884518		

^{n.s.} Não significativo ($P > 0,05$); *, ** $P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente.

Quadro 14A – Teste t de comparação de médias entre coelhos diabéticos testemunhas (TD) e que receberam naringenina (N) com relação a peso e constituintes sanguíneos (experimento 2)

Variável	Dias após aplicação flavonóide	Média		Teste t	gl	Probabilidade	Tamanho da amostra		Desvio-padrão		Teste F - razão	Probabilidade
		TD	N				TD	N	TD	N		
Peso	-4	2308,0	2260,0	0,315	8	0,761	5	5	303,37	154,39	3,861	0,219
	29	2498,0	2340,0	0,644	8	0,538	5	5	264,16	480,83	3,313	0,273
Colesterol	-3	318,4	370,6	-0,396	8	0,702	5	5	184,02	230,41	1,568	0,674
	29	102,0	139,8	-1,302	8	0,229	5	5	20,84	61,45	8,695	0,059
Glicose:	-1	467,1	425,9	0,497	8	0,632	5	5	125,72	136,23	1,174	0,880
	29	392,6	392,5	0,001	8	0,999	5	5	166,04	221,34	1,777	0,591
Triacilglicerol	-3	2219,1	3300,4	-0,612	8	0,557	5	5	2503,37	3055,06	1,489	0,709
	29	98,2	125,7	-1,009	8	0,343	5	5	22,07	56,86	6,637	0,094
Creatinina	-3	2,0	1,7	1,108	8	0,300	5	5	0,58	0,21	7,344	0,079
	29	1,9	1,8	0,525	4,4	0,625	5	5	0,42	0,10	18,038	0,016
Albumina	-3	4,8	4,6	0,746	8	0,477	5	5	0,32	0,49	2,330	0,433
	29	4,1	4,0	1,559	8	0,158	5	5	0,13	0,16	1,479	0,714

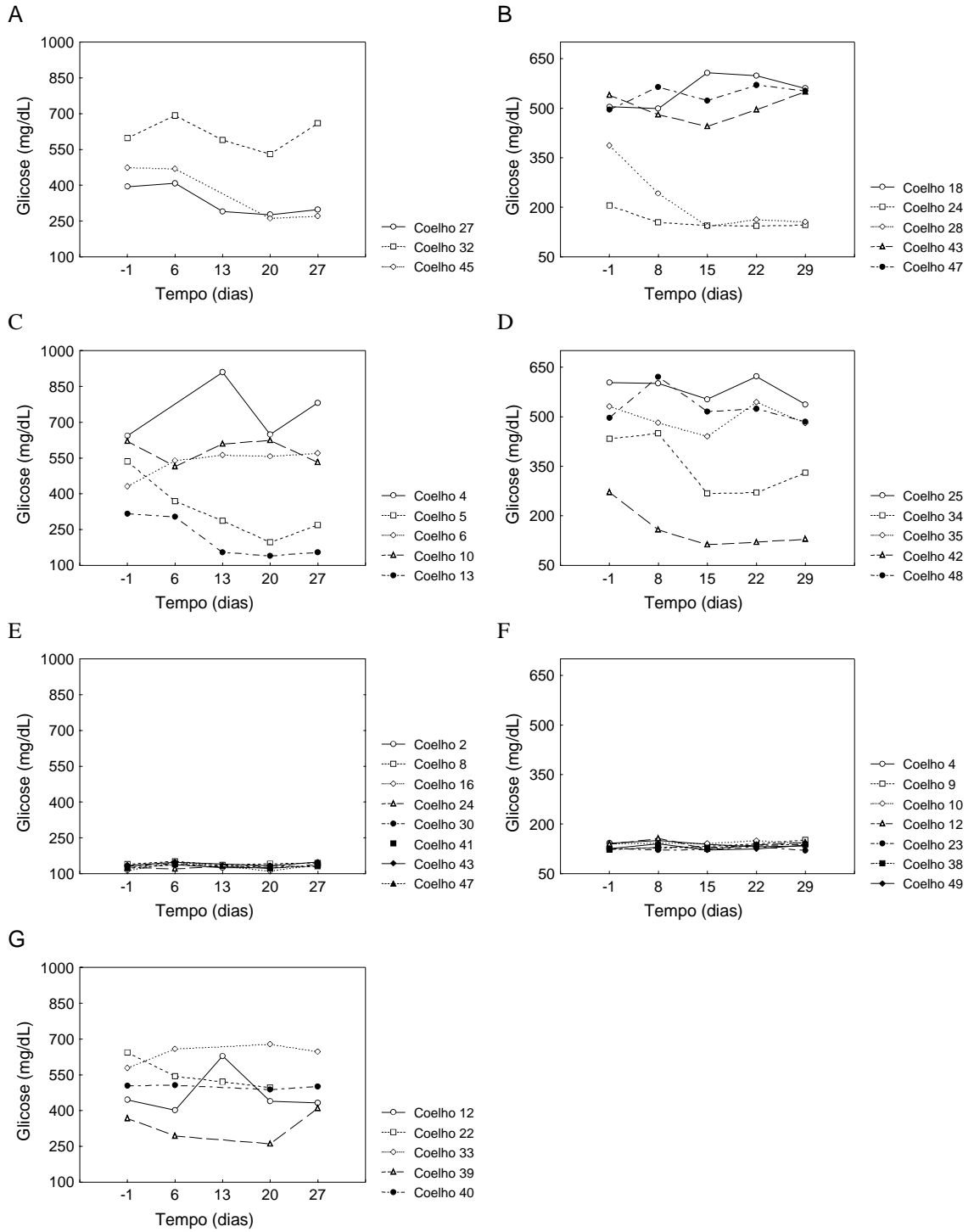


Figura 1A – Variação da glicemia de coelhos, segundo os tratamentos naringenina (A e B), testemunhas diabética (C e D), normal (E e F) e fruta-de-lobo (G) dos experimento 1 (A, C, E e G) e 2 (B, D e F). O tempo zero é o dia do início da administração dos tratamentos.

APÊNDICE B

Quadro 1B – Teste t do efeito das dietas básica (db) e modificada (dm) no peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos que não receberam aloxano (testemunhas normais) (experimento 1)

	Dias após início dieta	Dieta		Teste t	gl	Probabilidade	s (db)	s (dm)	F (s_1^2 / s_2^2)	Probabilidade
		Básica (db)	Modificada (dm)							
Peso	2	280,00	274,40	0,319	8,00	0,758	28,35	27,17	1,088	0,937
	42	355,00	369,25	-0,558	7,00	0,594	48,70	14,89	10,705	0,080
Consumo alimentar	3 a 41	630,24	581,19	0,697	8,00	0,506	84,82	132,67	2,446	0,407
Creatinina	10	0,82	0,71	0,577	8,00	0,580	0,39	0,17	5,369	0,132
	42	0,74	0,69	0,491	7,00	0,638	0,17	0,08	4,311	0,260
Colesterol	10	101,78	108,06	-0,705	8,00	0,501	16,75	10,80	2,409	0,415
	42	139,24	138,13	0,081	7,00	0,938	19,63	21,80	1,233	0,815
Triacilgliceróis	10	98,92	114,66	-0,925	8,00	0,382	20,24	32,21	2,534	0,390
	42	134,08	158,83	-1,107	7,00	0,305	38,19	25,44	2,253	0,530
Glicose	10	121,68	147,50	-2,793	7,00	0,027	9,12	16,44	3,251	0,360
	42	151,10	129,68	0,568	4,24	0,599	83,20	12,79	42,283	0,011
Albumina	10	4,78	4,85	-0,710	8,00	0,498	0,18	0,12	2,224	0,458
	42	4,37	4,60	-2,625	7,00	0,034	0,15	0,11	1,853	0,640

Quadro 2B – Teste t de peso, consumo alimentar e constituintes sangüíneos, 6 dias após a aplicação de aloxano, em ratos que receberam dieta básica ou modificada (experimento 1)

	Dieta		Teste t	gl	P ³	F (s ₁ ² / s ₂ ²)	P
	Básica	Modificada					
Peso	243,83	245,65	-0,181	48	0,857	1,14	0,741
Consumo ¹	118,21	133,50	-1,768	48	0,083	1,85	0,136
Creatinina	0,58	0,63	-1,047	48	0,300	1,57	0,273
Colesterol	102,44	112,93	-1,685	48	0,099	1,15	0,734
Triacilgliceróis	110,85	126,15	-0,949	43,1 ²	0,348	2,40	0,038
Glicose	143,42	199,04	-1,820	37,9 ²	0,077	3,82	0,02
Albumina	4,28	4,26	0,345	48	0,731	2,13	0,073
N ^o de ratos	24	26					

¹ Período de 9 dias.

² O teste t foi computado para a situação em que não há homogeneidade de variância entre os 2 tratamentos.

³ Probabilidade.

Quadro 3B – Concentração dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta no experimento 1

Constituintes sanguíneos	Dias após início aplicação flavonóide	Dieta					
		Básica			Modificada		
		Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina
Creatinina	-3	0,82 ± 0,49 a ²	1,04 ± 0,40 a	0,75 ± 0,12 a	0,71 ± 0,21 a	0,90 ± 0,42 a	1,06 ± 0,25 a
	8	0,57 ± 0,16	0,66 ± 0,12	0,68 ± 0,25	0,57 ± 0,14	0,72 ± 0,38	0,72 ± 0,20
	15	0,75 ± 0,31	0,69 ± 0,18	0,55 ± 0,17	0,60 ± 0,15	0,72 ± 0,32	0,67 ± 0,19
	29	0,74 ± 0,21 a	0,80 ± 0,25 a	0,72 ± 0,17 a	0,69 ± 0,13 a	0,85 ± 0,50 a	0,84 ± 0,16 b
Colesterol	-3	101,8 ± 20,8 a	118,8 ± 25,7 a	110,0 ± 21,5 a	108,1 ± 13,4 a	115,9 ± 43,5 a	131,3 ± 19,3 a
	8	116,6 ± 34,4	112,1 ± 14,8	118,1 ± 23,0	106,1 ± 10,5	121,9 ± 34,5	115,7 ± 36,6
	15	127,2 ± 8,1	144,3 ± 10,1	133,2 ± 14,9	124,3 ± 18,2	138,9 ± 44,3	152,6 ± 17,5
	29	139,2 ± 24,4 b	135,3 ± 16,2 a	129,7 ± 11,6 a	138,1 ± 34,7 b	130,3 ± 35,0 a	141,8 ± 16,2 a
Triacilglicerol	-3	98,9 ± 25,1 a	112,4 ± 42,4 a	132,9 ± 35,6 a	114,7 ± 40,0 a	108,2 ± 62,5 a	158,5 ± 50,9 a
	8	112,8 ± 51,4	158,9 ± 42,3	139,1 ± 42,2	116,2 ± 31,3	150,3 ± 103,5	141,0 ± 88,3
	15	91,1 ± 15,8	130,2 ± 44,7	125,5 ± 54,9	134,3 ± 29,5	145,4 ± 81,7	142,1 ± 50,9
	29	134,1 ± 47,4 a	152,9 ± 39,8 a	134,7 ± 49,5 a	158,8 ± 40,5 b	180,4 ± 130,5 a	155,8 ± 53,6 a
Glicose	-1	121,7 ± 14,5 a ³	153,2 ± 34,2 a	138,4 ± 18,1 a	147,5 ± 20,4 a	197,4 ± 168,6 a	184,0 ± 100,9 a
	8	107,7 ± 42,2	169,3 ± 124,8	122,5 ± 20,6	125,1 ± 24,6	211,8 ± 251,7	234,4 ± 216,3
	15	118,0 ± 24,8	130,2 ± 39,0	128,6 ± 17,1	119,8 ± 12,2	265,9 ± 421,9	169,7 ± 79,2
	29	151,1 ± 103,3 a	195,9 ± 213,4 a	124,6 ± 27,0 a	129,7 ± 20,4 a	268,7 ± 371,1 a	228,5 ± 223,5 a
Albumina (g.dL ⁻¹)	-3	4,78 ± 0,23 a	4,68 ± 0,32 a	4,62 ± 0,08 a	4,85 ± 0,15 a	4,78 ± 0,32 a	4,73 ± 0,34 a
	8	4,31 ± 0,34	4,11 ± 0,46	4,39 ± 0,19	4,42 ± 0,34	4,34 ± 0,83	4,25 ± 0,26
	15	4,54 ± 0,20	4,68 ± 0,25	4,46 ± 0,10	4,67 ± 0,40	4,48 ± 0,65	4,59 ± 0,34
	29	4,37 ± 0,18 b	4,25 ± 0,40 b	4,19 ± 0,10 b	4,60 ± 0,17 b	4,20 ± 0,42 b	4,20 ± 0,11 b
Nº de ratos		5	5	5	5	8	6

¹ Ratos que não receberam aloxano.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, pelo teste t (P < 0,05).

Quadro 4B – Peso e consumo alimentar dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 1)

Variável	Dias após início aplicação flavonóide	Dieta					
		Básica			Modificada		
		Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina
Peso (g)	-1	291,2 ± 39,3 ² a ³	256,0 ± 60,1 a	294,8 ± 29,8 a	295,4 ± 32,6 a	282,1 ± 87,3 a	279,5 ± 43,6 a
	8	296,7 ± 192,0	285,4 ± 73,1	328,6 ± 38,6	330,0 ± 29,9	297,5 ± 55,4	307,7 ± 55,2
	15	315,6 ± 71,4	293,4 ± 85,0	335,0 ± 35,3	334,5 ± 28,0	296,4 ± 89,8	309,5 ± 65,0
	22	338,8 ± 63,8	319,2 ± 86,2	355,4 ± 34,0	360,3 ± 22,5	322,6 ± 85,0	336,5 ± 70,2
	29	355,0 ± 60,5 b	338,8 ± 94,8 b	364,6 ± 38,6 a	369,3 ± 23,7 b	320,8 ± 104,6 b	344,5 ± 68,8 b
Consumo alimentar (g)	-1 a 7	157,6 ± 53,1	171,0 ± 14,35	165,7 ± 25,2	166,5 ± 20,9	200,3 ± 108,3	192,3 ± 33,9
	8 a 14	92,9 ± 41,8	130,5 ± 65,5	110,0 ± 7,5	110,3 ± 13,0	144,2 ± 93,3	135,5 ± 42,7
	15 a 21	95,9 ± 22,4	121,9 ± 27,8	102,7 ± 9,4	111,0 ± 10,2	133,6 ± 66,8	135,3 ± 28,1
	22 a 28	146,2 ± 40,8	151,1 ± 45,2	121,2 ± 17,2	125,4 ± 10,7	161,0 ± 93,8	152,6 ± 51,5
	-1 a 28	492,7 ± 82,1	574,3 ± 146,5	499,6 ± 42,4	443,9 ± 180,5	639,0 ± 345,8	615,8 ± 150,0
N ^o de ratos		5	5	5	5	8	6

¹ Ratos que não receberam aloxano.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, pelo teste t (P > 0,05).

Quadro 5B – Teste t entre valores inicial e final¹ de peso e constituintes sanguíneos de ratos no experimento 1.

Variável	Média		Diferença	s(d)	Teste t	gl	Probabilidade
	Inicial	Final					
Dieta básica – Testemunha diabética							
Peso	256	338,8	82,8	41,2	4,49	4	0,011
Creatinina	1,038	0,796	-0,242	0,26	-2,05	4	0,11
Colesterol	118,8	135,32	16,52	14,8	2,49	4	0,067
Triacilgliceróis	112,4	152,92	40,52	47,8	1,89	4	0,131
Glicose	153,2	195,92	42,72	144,9	0,66	4	0,546
Albumina	4,68	4,25	-0,43	0,14	-6,85	4	0,002
Dieta básica – Naringenina							
Peso	294,8	364,6	69,8	9,12	17,11	4	6,84 x 10 ⁻⁵
Creatinina	0,75	0,72	-0,03	0,17	-0,39	4	0,714
Colesterol	109,96	129,72	19,76	26,16	1,69	4	0,166
Triacilgliceróis	132,86	134,72	1,86	43,22	0,1	4	0,928
Glicose	138,36	124,62	-13,74	30,35	-1,01	4	0,369
Albumina	4,618	4,19	-0,428	0,08	-11,46	4	3,3 x 10 ⁻⁴
Dieta básica – Testemunha normal							
Peso	291,2	355	63,8	20,3	7,03	4	0,002
Creatinina	0,824	0,736	-0,088	0,47	-0,41	4	0,7
Colesterol	139,24	101,78	37,46	26,18	3,19	4	0,033
Triacilgliceróis	98,92	134,08	35,16	47,46	1,66	4	0,173
Glicose	121,675	157,275	35,6	99,91	0,71	3	0,528
Albumina	4,778	4,37	-0,408	0,24	-3,87	4	0,018
Dieta modificada – Testemunha diabética							
Peso	282,1	320,8	38,63	37,55	2,91	7	0,023
Creatinina	0,90	0,76	-0,14	0,26	-1,5	6	0,185
Colesterol	115,9	130,3	14,4	20,78	1,97	7	0,09
Triacilgliceróis	108,2	180,4	72,2	92,32	2,21	7	0,063
Glicose	197,4	268,7	71,3	123,21	1,64	7	0,146
Albumina	4,78	4,2	-0,58	0,15	-10,88	7	1,22 x 10 ⁻⁵
Dieta modificada – Naringenina							
Peso	279,5	344,5	65	31,3	5,09	5	0,004
Creatinina	1,06	0,84	-0,22	0,2	-2,96	5	0,031
Colesterol	131,3	141,8	10,5	28,8	0,89	5	0,416
Triacilgliceróis	158,5	155,8	-2,7	75,4	-0,09	5	0,934
Glicose	184,0	228,5	44,5	125,6	0,87	5	0,425
Albumina	4,73	4,20	-0,53	0,3	-3,71	5	0,014
Dieta modificada – Testemunha normal							
Peso	285,8	369,3	83,5	9,3	18,04	3	3,7 x 10 ⁻⁴
Creatinina	0,65	0,69	0,04	0,08	1	3	0,391
Colesterol	107,9	138,1	30,2	11,6	5,22	3	0,014
Triacilgliceróis	101,8	158,8	57	26,5	4,31	3	0,023
Glicose	129,7	142,9	13,2	25	1,06	3	0,367
Albumina	4,88	4,6	-0,28	0,05	-12,16	3	0,001

¹ Mensurada aos -1 e 29 dias após o início da administração do flavonóide para peso e glicose e -3 e 29 dias para os demais constituintes sanguíneos.

Quadro 6B – Teste de pressuposição das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 1)¹

Variável	Teste de Box ¹			
	M	χ^2	gl	Probabilidade
Peso ²	18,758	14,924	10	0,135
Creatinina ³	5,352	4,471	6	0,613
Colesterol ³	10,644	8,951	6	0,176
Triacilgliceróis ³	12,822	10,782	6	0,095
Glicose ³	37,210	31,291	6	2,23 x 10 ⁻⁵
Albumina ³	7,962	6,695	6	0,350

	Teste da condição H - F			
	w ⁴	χ^2	gl	Probabilidade
Peso ²	0,104	42,447	5	4,78 x 10 ⁻⁸
Creatinina ³	0,951	0,856	2	0,652
Colesterol ³	0,682	6,890	2	0,032
Triacilgliceróis ³	0,705	6,300	2	0,043
Glicose ³	0,726	5,773	2	0,056
Albumina ³	0,534	11,304	2	0,004

¹ Ho: As matrizes de covariância são iguais para todos os tratamentos (MORRISON, 1990).

² Mensurada aos oito, 15, 22 e 29 dias após o início da aplicação do flavonóide.

³ Mensurada aos oito, 15 e 29 dias após o início da aplicação do flavonóide.

⁴ Critério de Mauchly (MORRISON, 1990).

Quadro 7B - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos ao final do experimento 1 ².

	Peso	Consumo alimentar	Creatinina	Colesterol	Tg ⁴	Glicose	Albumina
Peso	----	0,92 **	-0,64	-0,24	-0,13	-0,80 **	0,39
Consumo alimentar ³	-0,73 **	----	-0,74 *	-0,47	-0,43	-0,89 **	0,09
Creatinina	-0,39	-0,03	----	0,68 *	0,55	0,77 *	0,14
Colesterol	0,28	-0,33	0,18	----	0,68	0,63	0,45
Tg	-0,15	-0,16	0,37	0,73 **	----	0,48	0,76 *
Glicose	-0,90 **	0,75 **	0,44	-0,24	0,14	----	-0,10
Albumina	0,58 *	-0,58 *	-0,05	0,50	0,19	-0,61 *	----

* ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 10 ratos testemunhas normais e a diagonal inferior, em 13 ratos testemunhas diabéticos.

² Trinta e nove dias após aplicação do aloxano.

³ Período de 38 dias.

⁴ Triacilgliceróis.

Quadro 8B - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos testemunha normal ao final do experimento 1 ²

	Peso	Consumo alimentar	Creatinina	Colesterol	Tg ⁴	Glicose	Albumina
Peso	-----	0,93 *	-0,72	-0,50	-0,22	-0,82	0,37
Consumo alimentar ³	0,95*	-----	-0,80	-0,73	-0,53	-0,91 *	0,06
Creatinina	0,09	-0,18	-----	0,89 *	0,71	0,86	0,31
Colesterol	0,63	0,40	0,36	-----	0,95 *	0,85	0,56
Tg	-0,37	-0,63	0,58	0,45	-----	0,68	0,75
Glicose	-0,15	-0,13	-0,57	0,31	0,28	-----	0,05
Albumina	0,32	0,02	0,68	0,89	0,76	0,14	-----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 5 ratos que se alimentaram de dieta básica, e a diagonal inferior, em 4 ratos que se alimentaram de dieta modificada.

² Trinta e nove dias após aplicação do aloxano.

³ Período de 38 dias.

⁴ Triacilgliceróis.

Quadro 9B - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos testemunhas diabéticos ao final do experimento 1 ²

	Peso	Consumo alimentar	Creatinina	Colesterol	Tg ⁴	Glicose	Albumina
Peso	-----	-0,86	0	0,64	-0,42	-0,95 *	0,34
Consumo alimentar ³	-0,77 *	-----	-0,17	-0,54	0,42	0,96 **	-0,74
Creatinina	-0,58	-0,02	-----	-0,40	-0,88 *	-0,13	0,44
Colesterol	0,12	-0,29	0,35	-----	0,10	-0,67	0,33
Tg	-0,06	-0,26	0,57	0,89 **	-----	0,47	-0,38
Glicose	-0,90 **	0,72	0,60	-0,09	0,04	-----	-0,62
Albumina	0,78 *	-0,60	-0,28	0,60	0,42	-0,62	-----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 5 ratos que se alimentaram de dieta básica, e a diagonal inferior, em 8 ratos que se alimentaram de dieta modificada.

² Trinta e nove dias após aplicação do aloxano.

³ Período de 38 dias.

⁴ Triacilgliceróis.

Quadro 10B - Correlação momento-produto de Pearson ¹ entre peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos diabéticos que receberam naringenina ao final do experimento 1 ²

	Peso	Consumo total	Creatinina	Colesterol	Tg ⁴	Glicose	Albumina
Peso	-----	0,69	-0,33	0,32	0,59	0,71	0,25
Consumo total ³	-0,77	-----	-0,06	0,50	0,71	0,84	0,71
Creatinina	-0,83 *	0,52	-----	-0,38	-0,17	0,33	0,48
Colesterol	-0,59	0,82 *	0,41	-----	0,91 *	0,31	0,54
Triacilgliceróis	-0,47	0,59	-0,01	0,62	-----	0,66	0,74
Glicose	-0,87 *	0,96 **	0,61	0,88 *	0,65	-----	0,80
Albumina	-0,98 **	0,69	0,76	0,52	0,48	0,82 *	-----

*. ** P < 0,05 e P < 0,01, respectivamente.

¹ A diagonal superior expressa a correlação baseada em 5 ratos que se alimentaram de dieta básica, e a diagonal inferior, em 6 ratos que se alimentaram de dieta modificada.

² Trinta e nove dias após aplicação do aloxano.

³ Período de 38 dias.

⁴ Triacilgliceróis.

Quadro 11B – Teste t de peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos, 6 dias após a aplicação de aloxano, em ratos que receberam dieta básica e modificada (experimento 2)

	Dieta		Teste t	gl	Probabilidade	F (s ₁ ² / s ₂ ²)	Probabilidade
	Básica	Modificada					
Peso	243,83	245,65	-0,181	48	0,857	1,14	0,741
Consumo ¹	118,21	133,50	-1,768	48	0,083	1,85	0,136
Creatinina	0,58	0,63	-1,047	48	0,300	1,57	0,273
Colesterol	102,44	112,93	-1,685	48	0,099	1,15	0,734
Triacilglicerol	110,85	126,15	-0,949	43,1 ²	0,348	2,40	0,038
Glicose	143,42	199,04	-1,820	37,9 ²	0,077	3,82	0,002
Albumina	4,28	4,26	0,345	48	0,731	2,13	0,073
Nº de ratos	24	26					

¹ Período de 9 dias.

² O teste t foi computado para a situação em que não há homogeneidade de variância entre os 2 tratamentos.

Quadro 12B – Efeito das dietas no peso, consumo alimentar e constituintes sanguíneos de ratos que não receberam aloxano (testemunhas normais): teste t

	Dias após início dieta	Dieta		teste t	gl	Probabilidade	s (db)	s (dm)	F (s_1^2 / s_2^2)	Probabilidade
		Básica (db)	Modificada (dm)							
Peso	3	257,8	264,4	-0,360	8	0,728	32,57	24,96	1,703	0,619
	39	338,6	374,6	-1,625	8	0,143	39,85	29,43	1,833	0,572
Consumo	3 a 39	617,2	659,2	-1,554	8	0,159	41,37	44,01	1,131	0,908
Creatinina	9	0,5	0,6	-1,313	8	0,226	0,09	0,14	2,158	0,475
	39	0,5	0,5	0,761	7	0,472	0,04	0,06	2,880	0,411
Colesterol	9	103,6	114,3	-1,383	8	0,204	11,95	12,47	1,088	0,937
	39	107,9	130,6	-1,307	8	0,228	34,78	17,36	4,015	0,207
Triacilglicerol	9	106,2	134,3	-1,191	8	0,268	21,86	47,92	4,806	0,158
	39	109,7	171,9	-1,726	8	0,123	46,14	65,98	2,045	0,506
Glicose	9	127,2	129,5	-0,161	8	0,876	27,16	16,90	2,584	0,380
	39	107,9	121,4	-1,223	8	0,256	15,21	19,39	1,625	0,650
Albumina	9	4,3	4,6	-3,406	8	0,009	0,17	0,11	2,253	0,451
	39	4,2	4,3	-0,719	8	0,493	0,24	0,12	3,928	0,214

Quadro 13B – Concentração dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 2)

Constituintes sanguíneos	Dias após início do flavonóide	Dieta básica			Dieta modificada		
		Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina
Creatinina	-1	0,51 ± 0,12 a ²	0,52 ± 0,06 a	0,70 ± 0,25 a	0,61 ± 0,17 a	0,63 ± 0,10 a	0,68 ± 0,08 a
	7	0,53 ± 0,07	0,67 ± 0,29	0,59 ± 0,07	0,52 ± 0,16	0,61 ± 0,09	0,64 ± 0,14
	14	0,57 ± 0,12	0,60 ± 0,12	0,59 ± 0,07	0,55 ± 0,07	0,67 ± 0,09	0,57 ± 0,08
	27	0,49 ± 0,06 a	0,52 ± 0,07 a	0,49 ± 0,11 a	0,47 ± 0,08 a	0,51 ± 0,10 a	0,49 ± 0,06 b
Colesterol	-1	103,6 ± 14,8 a	103,3 ± 21,3 a	103,0 ± 23,1 a	114,3 ± 15,5 a	106,6 ± 21,2 a	121,8 ± 22,2 a
	7	122,7 ± 27,3	129,2 ± 18,3	127,7 ± 25,0	141,6 ± 22,3	114,8 ± 19,8	133,7 ± 13,0
	14	122,4 ± 10,5	129,8 ± 16,0	120,1 ± 21,9	135,2 ± 16,2	123,7 ± 29,0	140,3 ± 12,2
	27	107,9 ± 43,2 a	125,3 ± 25,9 a	125,1 ± 16,6 a	130,6 ± 21,5 a	133,1 ± 20,6 b	129,5 ± 10,8 b
Triacilgliceróis	-1	106,2 ± 27,1 a	131,4 ± 45,6 a	118,6 ± 60,0 a	134,3 ± 59,0 a	142,9 ± 38,8 a	138,7 ± 92,9 a
	7	99,8 ± 25,3	158,7 ± 45,2	124,2 ± 34,0	172,1 ± 80,7	128,6 ± 34,7	170,9 ± 37,6
	14	94,4 ± 36,1	119,0 ± 47,9	92,5 ± 27,0	174,1 ± 64,2	173,7 ± 96,7	163,3 ± 41,4
	27	109,7 ± 57,3 a	137,6 ± 50,6 a	120,7 ± 25,2 a	171,9 ± 81,9 a	170,4 ± 54,6 a	126,4 ± 24,7 a
Glicose	-1	127,2 ± 33,7 a ³	195,7 ± 120,5 a	165,5 ± 38,9 a	129,5 ± 21,0 a	276,2 ± 157,8 a	248,3 ± 117,3 a
	7	125,3 ± 18,4	311,3 ± 303,6	161,7 ± 101,3	143,6 ± 26,2	312,7 ± 230,0	303,9 ± 144,9
	14	119,7 ± 20,3	252,2 ± 198,0	190,4 ± 214,8	124,2 ± 28,4	381,7 ± 246,6	342,7 ± 222,7
	27	107,9 ± 18,9 a	210,9 ± 164,4 a	169,0 ± 147,5 a	121,4 ± 24,1 a	403,7 ± 227,3 a	345,8 ± 190,4 a
Albumina (g.dL ⁻¹)	-1	4,33 ± 0,21 a	4,22 ± 0,20 a	4,32 ± 0,26 a	4,64 ± 0,14 a	4,15 ± 0,34 a	4,31 ± 0,32 a
	7	4,51 ± 0,15	4,31 ± 0,20	4,37 ± 0,29	4,81 ± 0,22	4,37 ± 0,37	4,51 ± 0,28
	14	4,49 ± 0,23	4,46 ± 0,34	4,54 ± 0,27	4,70 ± 0,20	4,34 ± 0,40	4,34 ± 0,31
	27	4,20 ± 0,30 a	4,04 ± 0,31 a	4,15 ± 0,11 a	4,27 ± 0,15 b	3,96 ± 0,38 a	3,89 ± 0,30 b
Nº de ratos	5	6	6	5	7	8	

¹ Ratos que não receberam aloxano.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, pelo teste t (P > 0,05).

Quadro 14B – Peso e consumo alimentar dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina, segundo a dieta (experimento 2)

	Dias após início do flavonóide	Dieta					
		Básica			Modificada		
		Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Testemunha normal ¹	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina
Peso (g)	-1	274,0 ± 35,1 ² a ³	241,0 ± 40,5 a	239,8 ± 43,7 a	286,8 ± 24,7 a	242,4 ± 37,9 a	249,9 ± 32,4 a
	7	305,2 ± 36,0	255,0 ± 56,5	259,3 ± 42,2	318,8 ± 32,7	246,6 ± 53,9	263,1 ± 53,8
	14	313,2 ± 45,2	267,2 ± 65,9	294,3 ± 63,5	338,4 ± 33,3	237,3 ± 54,0	277,9 ± 62,4
	20	339,4 ± 46,6	292,2 ± 75,1	309,7 ± 57,1	362,8 ± 34,4	256,4 ± 66,9	292,3 ± 68,1
	27	338,6 ± 49,5 b	293,2 ± 91,6 a	316,7 ± 59,2 b	374,6 ± 36,5 b	262,1 ± 77,1 a	294,6 ± 73,5 a
Consumo alimentar (g)	-1 a 6	145,8 ± 12,6	176,6 ± 40,9	156,0 ± 41,8	158,7 ± 16,1	211,0 ± 52,3	201,1 ± 17,7
	7 a 13	115,2 ± 12,7	130,7 ± 36,2	134,9 ± 26,4	115,2 ± 10,8	134,4 ± 59,5	165,8 ± 29,5
	14 a 20	117,2 ± 13,6	154,9 ± 37,9	131,0 ± 27,3	122,5 ± 11,5	164,7 ± 51,1	165,3 ± 37,5
	21 a 26	103,1 ± 25,1	139,4 ± 35,6	131,2 ± 38,2	115,8 ± 12,7	198,0 ± 62,7	175,8 ± 43,5
	-1 a 26	481,3 ± 45,6	601,6 ± 137,2	553,1 ± 130,0	512,2 ± 45,0	708,1 ± 214,85	708,0 ± 120,3
Nº de ratos		5	6	6	5	7	8

¹ Ratos que não receberam aloxano.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, pelo teste t (P > 0,05).

Quadro 15B – Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sanguíneos de ratos no experimento 2.

Variável	Média		Diferença	s(d)	Teste T	gl	Probabilidade
	Inicial	Final					
Dieta básica – Testemunha diabética							
Peso	241	293,2	52,2	54,3	2,36	5	0,065
Creatinina	0,5217	0,5192	-0,0025	0,07	-0,09	5	0,934
Colesterol	103,3	125,3	22	30,2	1,79	5	0,134
Triacilgliceróis	131,4	137,6	6,2	63,4	0,24	5	0,819
Glicose	195,7	210,9	15,2	58,9	0,63	5	0,555
Albumina	4,22	4,04	-0,18	0,2	-2,07	5	0,093
Dieta básica – Naringenina							
Peso	239,8	316,7	76,9	38,6	4,87	5	0,005
Creatinina	0,7	0,49	-0,21	0,24	-2,07	5	0,093
Colesterol	103	125,1	22,1	32,8	1,66	5	0,158
Triacilgliceróis	118,6	120,7	2,1	68,1	0,07	5	0,943
Glicose	165,5	169	3,5	150,3	0,06	5	0,956
Albumina	4,32	4,15	-0,17	0,21	-1,95	5	0,109
Dieta básica – Testemunha normal							
Peso	274	338,6	64,6	17,5	8,23	4	0,001
Creatinina	0,53	0,5	-0,03	0,07	-0,93	3	0,419
Colesterol	103,6	107,9	4,3	31,1	0,31	4	0,775
Triacilgliceróis	106,2	109,7	3,5	44,6	0,18	4	0,869
Glicose	127,2	107,9	-19,3	24,7	-1,75	4	0,155
Albumina	4,3	4,2	-0,1	0,17	-1,87	4	0,135
Dieta modificada – Testemunha diabética							
Peso	242,4	262,1	19,7	47,8	1,09	6	0,317
Creatinina	0,63	0,51	-0,12	0,13	-2,44	6	0,051
Colesterol	102,9	133,1	30,2	28,5	2,59	5	0,049
Triacilgliceróis	144,5	170,4	25,9	54,4	1,16	5	0,297
Glicose	276,2	403,7	127,5	151,9	2,22	6	0,068
Albumina	4,15	3,96	-0,19	0,22	-2,03	5	0,098
Dieta modificada – Naringenina							
Peso	249,9	294,6	44,7	60,2	2,1	7	0,073
Creatinina	0,68	0,49	-0,19	0,08	-6,39	7	$3,72 \times 10^{-4}$
Colesterol	121,8	149,7	27,9	36,3	2,18	7	0,066
Triacilgliceróis	138,7	169,9	31,2	31	2,85	7	0,025
Glicose	248,3	345,8	97,5	127,5	2,16	7	0,067
Albumina	4,31	3,89	-0,42	0,11	-10,85	7	$1,25 \times 10^{-5}$
Dieta modificada – Testemunha normal							
Peso	286,8	374,6	87,8	11,6	16,88	4	$7,21 \times 10^{-5}$
Creatinina	0,61	0,47	-0,14	0,15	-2,05	4	0,11
Colesterol	114,3	130,6	16,3	15,8	2,3	4	0,083
Triacilgliceróis	134,3	171,9	37,6	34,6	2,43	4	0,072
Glicose	129,5	121,4	-8,1	30,2	-0,61	4	0,577
Albumina	4,64	4,27	-0,37	0,07	12,54	4	$2,32 \times 10^{-4}$

^T Mensurada aos -1 e 27 dias após o início da administração do flavonóide para peso e demais constituintes sanguíneos.

Quadro 16B – Teste de pressuposição das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 2)¹

Variável	Teste de Box ¹			
	M	χ^2	gl	Probabilidade
Peso ²	15,851	13,119	10	0,217
Creatinina ³	10,869	9,453	6	0,150
Colesterol ³	9,018	7,741	6	0,258
Triacilgliceróis ³	8,712	7,478	6	0,279
Glicose ³	42,409	36,612	6	$2,1 \times 10^{-6}$
Albumina ³	10,514	9,025	6	0,172

Variável	Teste da condição H - F			
	w ⁴	χ^2	gl	Probabilidade
Peso ²	0,140	42,779	5	$4,1 \times 10^{-8}$
Creatinina ³	0,623	10,403	2	0,006
Colesterol ³	0,883	2,481	2	0,289
Triacilgliceróis ³	0,908	1,936	2	0,380
Glicose ³	0,610	10,376	2	0,006
Albumina ³	0,804	4,369	2	0,113

¹ Ho: As matrizes de covariância são iguais para todos os tratamentos (MORRINSON, 1990).

² Mensurada aos 8, 15, 22 e 29 dias após o início da aplicação do flavonóide.

³ Mensurada aos 8, 15 e 29 dias após o início da aplicação do flavonóide.

⁴ Critério de Mauchly (MORRISON, 1990).

Quadro 17B – Peso, consumo alimentar (g) e concentração dos constituintes sanguíneos (mg.dL⁻¹) dos ratos testemunhas e dos que receberam naringenina e dieta básica ou modificada (experimento 3)

	Dias ¹	Dieta				
		Básica		Modificada		
		Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	Diabéticos testemunha	Diabéticos + naringenina	
Peso			-3	266,0 ± 79,7 ² a ³	300,8 ± 79,1 a	278,9
			6	276,40 ± 88,46	317,00 ± 92,72	297,3
			12	279,00 ± 94,36	330,40 ± 93,95	297,5
			19	293,00 ± 100,16	356,00 ± 102,36	314,3
			26	298,00 ± 116,82 a	360,80 ± 114,90 b	314,25
		Consumo alimentar	0 a 5	141,45 ± 55,04	97,33 ± 62,09	147,3
			6 a 11	141,63 ± 48,13	129,05 ± 46,44	152,5
			12 a 19	154,14 ± 39,33	148,96 ± 27,38	186,6
			21 a 25	138,38 ± 41,20	119,66 ± 35,03	165,4
			0 a 25	575,60 ± 169,68	494,99 ± 129,53	651,93
Creatinina	-1	0,67 ± 0,17 ¹ a ²	0,66 ± 0,16 a	0,89 ± 0,23 a	0,80 ± 0,12 a	
	6	0,69 ± 0,18	0,59 ± 0,09	0,75 ± 0,16	0,67 ± 0,15	
	12	0,67 ± 0,23	0,54 ± 0,10	0,53 ± 0,05	0,50 ± 0,09	
	26	0,55 ± 0,11 a	0,58 ± 0,13 a	0,56 ± 0,05 b	0,58 ± 0,07 b	
Colesterol	-1	120,16 ± 12,64 a	132,40 ± 19,82 a	136,39 ± 15,62 a	121,99 ± 11,31 a	
	6	120,52 ± 21,59	129,28 ± 24,76	124,10 ± 13,82	134,90 ± 19,02	
	12	117,18 ± 24,66	134,54 ± 13,95	117,46 ± 11,52	143,50 ± 40,06	
	26	123,76 ± 26,56 a	122,56 ± 17,02 a	116,59 ± 16,99 b	132,64 ± 35,44 a	
Tg ⁴	-1	110,18 ± 65,14 a	125,02 ± 57,51 a	133,89 ± 40,74 a	173,33 ± 96,24 a	
	6	119,22 ± 31,96	131,26 ± 62,72	152,98 ± 39,93	199,09 ± 95,80	
	12	120,16 ± 58,88	156,72 ± 72,71	159,86 ± 43,92	230,21 ± 126,48	
	26	101,78 ± 30,01 a	145,96 ± 77,47 a	154,43 ± 51,10 a	215,28 ± 141,5 a	
Glicose	-1	203,12 ± 188,6 a	145,52 ± 46,89 a	326,09 ± 179,9 a	289,64 ± 150,0 a	
	6	240,96 ± 229,58	138,38 ± 13,32	305,70 ± 201,63	296,44 ± 194,51	
	12	232,80 ± 281,66	134,80 ± 27,95	290,69 ± 159,29	267,50 ± 164,43	
	26	246,18 ± 206,9 a	138,28 ± 25,36 a	324,09 ± 173,6 a	314,60 ± 181,1 a	
Albumina (g.dL ⁻¹)	-1	4,50 ± 0,22 a	4,58 ± 0,25 a	4,65 ± 0,32 a	4,39 ± 0,24 a	
	6	4,25 ± 0,22	4,32 ± 0,21	4,13 ± 0,23	4,21 ± 0,20	
	12	3,88 ± 0,18	4,06 ± 0,25	3,87 ± 0,21	3,79 ± 0,28	
	26	3,71 ± 0,28 b	3,85 ± 0,17 b	3,57 ± 0,48 b	3,56 ± 0,41 b	
Nº de ratos		5	5	8	8	

¹ Dias após o início da administração de naringenina.

² Média ± intervalo de confiança (μ)_{0,95}.

³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna, indica que não houve diferença significativa entre o valor inicial e o final de cada constituinte sanguíneo, pelo teste t (P < 0,05).

⁴ Triacilgliceróis.

Quadro 18B – Teste t entre valores inicial e final de peso e constituintes sanguíneos de ratos no experimento 3

Variável	Média		Diferença	s(d)	Teste T	gl	Probabilidade
	Inicial	Final					
Dieta básica – Testemunha diabética							
Peso	266	298	32	39,2	1,83	4	0,142
Creatinina	0,67	0,55	-0,12	0,14	-2,03	4	0,113
Colesterol	120,2	123,8	3,6	25,8	0,31	4	0,771
Triacilgliceróis	110,2	101,8	-8,4	37,3	-0,5	4	0,641
Glicose	203,1	246,2	43,1	58,8	1,64	4	0,177
Albumina	4,5	3,71	-0,79	0,14	-12,47	4	0,00024
Dieta básica – Naringenina							
Peso	300,8	360,8	60	31,3	4,28	4	0,013
Creatinina	0,66	0,58	-0,08	0,09	-1,95	4	0,122
Colesterol	132,4	122,6	-9,8	17,3	-1,27	4	0,272
Triacilgliceróis	125	146	21	92,8	0,5	4	0,64
Glicose	145,5	138,3	-7,2	38	-0,43	4	0,692
Albumina	4,6	3,85	-0,75	0,13	-13,13	4	0,000194
Dieta modificada – Testemunha diabética							
Peso	278,9	314,3	35,4	43,7	2,29	7	0,056
Creatinina	0,89	0,56	-0,33	0,3	-3,12	7	0,017
Colesterol	136,4	116,6	-19,8	17,1	-3,27	7	0,014
Triacilgliceróis	133,9	154,4	20,5	67	0,87	7	0,415
Glicose	326,1	324,1	-2	78,8	-0,07	7	0,945
Albumina	4,65	3,57	-1,08	0,6	-5,08	7	0,001
Dieta modificada – Naringenina							
Peso	283,1	305,4	22,3	46,4	1,36	7	0,217
Creatinina	0,81	0,58	-0,23	0,18	-3,68	7	0,008
Colesterol	122	132,6	10,6	39,3	0,77	7	0,469
Triacilgliceróis	173,3	215,3	42	138	0,86	7	0,418
Glicose	289,6	314,6	25	127,4	0,55	7	0,597
Albumina	4,39	3,56	-0,83	0,45	-5,24	7	0,001

¹ Mensurada aos -3 e 26 dias após o início da administração do flavonóide para peso e -1 e 26 para os demais constituintes sanguíneos.

Quadro 19B – Teste de pressuposição das análises de medidas repetidas do peso e constituintes sanguíneos dos ratos diabéticos em função da dieta e do flavonóide (experimento 3)¹

Variável	Teste de Box ¹			
	M	χ^2	gl	Probabilidade
Peso ²	6,048469	4,964785	10	0,893518
Creatinina ³	6,980851	5,991936	6	0,424094
Colesterol ³	19,56842	16,79633	6	0,010062
Triacilgliceróis ³	0,724347	6,12722	2	0,046719
Glicose ³	19,85306	17,04065	6	0,009135
Albumina ³	18,26132	15,56363	6	0,016298

Variável	Teste da condição H - F			
	w ⁴	χ^2	gl	Probabilidade
Peso ²	0,104466	46,80936	5	6,21 x 10 ⁻⁹
Creatinina ³	0,93988	1,240063	2	0,537927
Colesterol ³	0,875112	2,668066	2	0,263413
Triacilgliceróis ³	0,724347	6,12722	2	0,046719
Glicose ³	0,901032	2,084288	2	0,352698
Albumina ³	0,743614	5,628439	2	0,059951

¹ Ho: As matrizes de covariância são iguais para todos os tratamentos (MORRISON, 1990).

² Mensurada aos 8, 15, 22 e 29 dias após o início da aplicação do flavonóide.

³ Mensurada aos 8, 15 e 29 dias após o início da aplicação do flavonóide.

⁴ Critério de Mauchly (MORRISON, 1990).