

Laise Cedraz Pinto



**Características físico-químicas
e potencial farmacológico
do óleo da semente da
Annona muricata L. em
modelos de diabetes
melito tipo 1 *in vitro* e *in vivo***

Salvador
2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA (UFBA)
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DE ÓRGÃOS E SISTEMAS**

LAISE CEDRAZ PINTO

**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E POTENCIAL
FARMACOLÓGICO DO ÓLEO DA SEMENTE DA *Annona muricata* L.
EM MODELOS DE DIABETES MELITO TIPO 1 *in vitro* E *in vivo*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciência da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Camila Alexandrina Viana Figueirêdo
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Mariangela Vieira Lopes

**Salvador
2015**

P659c

Pinto, Laise Cedraz.

Características físico-químicas e potencial farmacológico do óleo da semente da *Annona muricata* L. em modelos de diabetes tipo 1 in vitro e in vivo / Laise Cedraz Pinto. – Salvador: 2015.

150f.: Il.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariangela Vieira Lopes

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

1 *Annona muricata*. 2. Diabetes tipo 1. 3. Ácido oléico. 4. Ácido linoleico. 5. Anonacina. I. Figueiredo, Camila Alexandrina Viana de. II. Lopes, Mariangela Vieira. III. UFBA. IV. Título.

CDU 665.52:543.5

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos catorze dias do mês de dezembro de dois mil e quinze, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública de Tese** da Doutoranda **Laise Cedraz Pinto Matos**, através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores Camila Alexandrina Viana Figueiredo, Luciana Lyra Casais e Silva, Tânia Tavares Rodriguez, Valdirene Leão Carneiro e Márcia Regina Piuvezam**. O título da Tese apresentada foi **Características físico-químicas e potencial farmacológico do óleo da semente da *Annona muricata* L. em modelo de diabetes *in vivo* e *in vitro***. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo APROVADA

Profa. Dra. Luciana Lyra Casais e Silva APROVADA


Profa. Dra. Tânia Tavares Rodriguez APROVADA


Profa. Dra. Valdirene Leão Carneiro APROVADA


Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam APROVADA


Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada por todos.


Salvador, 14 de dezembro de 2015

Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo 

Profa. Dra. Luciana Lyra Casais e Silva 

Profa. Dra. Tânia Tavares Rodriguez 

Profa. Dra. Valdirene Leão Carneiro 

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam 

Ao meu Pedro, que compartilhou comigo este doutorado, desde a sua vida intrauterina e é minha maior fonte de amor e força motivadora.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e ao meu filho, que compartilharam diariamente este momento, entre tantos motivos, pelas alegrias e suporte emocional, para conseguir concretizar esta etapa.

A toda minha família - mãe, pai, irmãos – e aos amigos, pelo apoio e a sempre torcida.

A minha orientadora, Profa. Camila Figueiredo, por ter me aceito como orientanda, pela sua disposição, competência, dinamismo, amizade. As etapas do percurso se tornaram mais brandas pela sua compreensão.

A todos que fazem parte do grupo IMUNOBIO, pelo companheirismo, colaborações, pelas parceiras, competências multiprofissionais e amizades. Todos vocês são especiais! Registro meu agradecimento a Ana Tereza, que desenvolveu o protocolo experimental de diabetes e pelo seu comprometimento nas análises, durante minha ausência temporária.

À Profa. Mariângela Lopes, por mais uma vez estar presente em mais esta etapa.

À Profa. Neuza Maria Alcântara Neves e todos os integrantes do Laboratório de Alergia e Acarologia (LAA), pelo apoio prestado.

À Profa. Karina Medeiros e colaboradores, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela parceria nas avaliações histológicas.

À Profa. Tânia Sarmiento da Silva e colaboradores, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela parceria nas análises cromatográficas.

À Profa. Carolina Oliveira e à Profa. Janice Druzian, da Faculdade de Farmácia (UFBA), pela parceria nas análises de perfil de ácidos graxos.

À parceria da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Salvador, Bahia) e da Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

À parceria do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), especialmente ao Prof. Crésio Alves; e do Laboratório de Análises Clínicas LABCHECAP, especialmente na pessoa de Vetúria Oliveira e de Vanda Baqueiro.

Aos Professores Marta Bittencourt, Helena Brandão, Dyego Oliveira, do Hospital Veterinário da UNIME (HOSVET), pela parceria nas análises bioquímicas.

Ao Programa de Pós-Graduação PIOS, especialmente à Coordenação e à Secretaria, pelo suporte e pelos esforços em manter a qualidade do Programa.

Às Instituições de fomento, CAPES e FAPESB, pelo apoio financeiro.

Todas as colaborações e parcerias foram imprescindíveis para a finalização deste trabalho. A todos, minha gratidão!

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

PINTO, Laise Cedraz. **Características físico-químicas e potencial farmacológico, do óleo da semente da *Annona muricata* L. em modelos de diabetes melito tipo 1 *in vivo* e *in vitro***. 2016. 150 f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Introdução: O diabetes tipo 1 autoimune é caracterizado pela destruição das células pancreáticas e ativação de mecanismos imunológicos celulares e humorais. O tratamento com insulina exógena é oneroso, apresenta efeito colateral, como a hipoglicemia, e não modula ação inflamatória pancreática. A busca de novos fármacos alternativos anti-inflamatórios e imunomoduladores torna-se uma estratégia para o controle dessa doença crônica. Ácidos graxos apresentam uma dinâmica de interação metabólica e podem desempenhar algum papel na diminuição dos eventos imunológicos e controle da homeostase glicêmica no diabetes melito tipo 1. A *Annona muricata* (graviola) é uma árvore que apresenta várias propriedades biológicas descritas na literatura, tais como gastroprotetora, antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, hipoglicemiante, antidiabética, dentre outras. A ação antidiabética já foi identificada, especialmente nos extratos da folha da graviola e há uma limitação de dados sobre caracterização e propriedades do óleo das sementes da planta. **Objetivos:** Caracterizar as propriedades físico-químicas e ação imunomoduladora do óleo da semente da graviola em modelos de diabetes melito tipo 1 *in vitro* e *in vivo*. **Metodologia:** Foram investigados: a composição centesimal, os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH ABTS e FRAP. O óleo das sementes foi extraído por Bligh-Dyer e o perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa. A presença de acetogeninas foi avaliada por espectrometria de massa e a massa molecular foi identificada por HPLC-DAD. A toxicidade *in vitro* do óleo (4000-7,8µg/mL) foi avaliada pelos ensaios do MTT-Tetrazólio e Resazurina sódica, em cultura de esplenócitos murino e de sangue total humano. A toxicidade *in vivo* foi avaliada após 14 dias de exposição ao óleo, com administração oral de doses de 0,5 e 1,0mL/Kg/peso. Sobrevida, glicemia, colesterol total, creatinina, ureia, alterações físicas e histopatologia hepática e renal foram avaliados. O protocolo experimental do DM1 induzido por STZ (3 x 100mg/Kg) foi de 48 dias em que camundongos BALB/c foram pré-tratados ou não com 1,0mL/Kg/peso do óleo por via oral. Glicemia, insulina, área das ilhotas, histopatologia hepática e pancreática, alterações físicas, ALT e creatinina foram avaliados. As citocinas IL-10, IL-4 e IL-17 foram dosadas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de animais diabéticos na presença ou não do óleo (125, 61,5 e 31µg/mL) por ELISA. Além disso, também por ELISA, IFN-γ e IL-10, foram dosados em cultura de sangue total de pacientes diabéticos ou controles não diabéticos, na presença ou não do óleo da graviola (125, 61,5 e 31µg/mL). **Resultados:** As sementes apresentaram teor de 18% de lipídios e 310-320mg% de compostos fenólicos. O óleo tem baixa ação antioxidante *in vitro* e é fonte de ácidos graxos oleico e linoleico. Acetogeninas foram confirmadas no óleo e frações, sendo a anonacina a mais predominante. O precipitado do óleo bruto apresentou toxicidade *in vivo*, diferente do óleo filtrado. Concentrações abaixo de 125µg/mL do óleo não apresentaram citotoxicidade *in vitro*. O tratamento dos animais diabéticos com o óleo (*Stz-FLOsg*) levou a um efeito anti-hiperglicêmico, preservou a área das ilhotas e diminuiu atrofia das ilhotas, recuperou parcialmente o glicogênio

hepático e evitou/regenerou danos oxidativos hepáticos. Em cultura de esplenócitos, a exposição do óleo na concentração de 125µg/mL aumentou a produção de IL-4 e IL-10. Em cultura de sangue total humano, a exposição ao óleo reduziu os níveis de IFN-γ e não alterou os níveis de IL-10. **Conclusão:** O óleo da semente da *A. muricata* apresentou qualidade nutritiva, potencial antidiabético, potencial imunomodulador e anti-inflamatório *in vitro*.

Palavras-chave: *Annona muricata*. Diabetes tipo 1. Ácido oleico. Ácido linoleico. Anonacina.

PINTO, Laise Cedraz. **Physical and chemical characterization and pharmacological potential of *Annona muricata* L. seed oil in experimental models of type 1 diabetes *in vitro* and *in vivo***. 2016. 150 s. PhD Thesis – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes is characterized by an autoimmune destruction of pancreatic cells and activation of cellular and humoral immune mechanisms. Treatment with exogenous insulin is expensive, has considerable side effects such as hypoglycemia and does not modulate pancreatic inflammation. New anti-inflammatory and immune modulatory agents could be a strategy for controlling this chronic disease. Fatty acids have a metabolic dynamic interaction and can play a role in decreasing the immunological events and control glucose homeostasis in type 1 diabetes. *Annona muricata* (soursop) is a plant with several biological properties already described in the literature such as gastroprotective, antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, hypoglycemic. Antidiabetic action has been identified, especially in the soursop leaf extracts, and there are limited data on characterization as well biological properties of soursop seeds oil. **Objective:** The aimed of this study were to characterize the physico-chemical and immune modulatory properties in the seeds oil in models of autoimmune diabetes *in vitro* and *in vivo*. **Methodology:** Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant activity were evaluated *in vitro* by DPPH ABTS and FRAP methods. Seeds oil was extracted by Blig-Dyer and the fatty acid profile was determined by gas chromatography. Presence of acetogenins was assessed by thin layer chromatography and the molecular weight was identified by HPLC-DAD. *In vitro* toxicity of the oil (4000-7.8µg/mL) was evaluated by the MTT-tetrazolium assays and Resazurin sodium in murine spleen cells culture and human whole blood culture. *In vivo* toxicity was assessed during 14 days exposure to the oil (0.5 and 1.0 mL oil/kg/weight). Survival, blood glucose, total cholesterol, creatinine, urea, physical changes, hepatic and renal histopathology were assessed. Murine model of type 1 diabetes was induced using STZ (3 x 100mg /Kg). The protocol last 48 days in BALB/c mice pre-treated or not with 1.0mL oil/Kg/weight orally. Blood glucose, insulin, islet area, liver and pancreatic histopathology, physical changes, ALT and creatinine were assessed. Cytokines IL-10, IL-17 and IL-4 were measured in supernatants of spleen cells culture from diabetic animals, exposed or not to the oil (125, 61.5 and 31µg /mL) by ELISA. Moreover, also by ELISA, IFN-γ and IL-10 were measured in whole blood culture from diabetic patients or healthy controls, exposed or not to the seeds oil (125, 61.5 and 31µg/mL). **Results:** In the characterization analysis, soursop seeds showed had 18% lipids and 310-320mg% of phenolic compounds. Seeds oil has low antioxidant activity *in vitro* and is a source of oleic and linoleic fatty acids. Acetogenins were confirmed in the oil and fractions and being annonacin the most prevalent one. Crude oil precipitate presented *in vivo* toxicity, unlike the filtered oil. Concentrations below 125µg/mL of the oil showed no cytotoxicity *in vitro*. Oil treatment in animals STZ-induced (*Stz-FLOsg*) led to an anti-hyperglycemic effect, preserved islets area and islet atrophy, decreased partially restored liver glycogen and avoided/regenerated hepatic oxidative damage. Oil exposed at 125µg/mL, in splenocytes culture, increased IL-4 and IL-10. In human whole blood culture, exposure to oil reduced IFN-γ levels and did not alter IL-10

levels. **Conclusion:** *A. muricata* seed oil showed nutritional quality, anti-diabetic potential, potential immune modulatory and anti-inflammatory *in vitro*.

Keywords: *Annona muricata*, type 1 diabetes. Oleic acid. Linoleic acid. Annonacin.

LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Características vegetais da <i>A. muricata</i> .	22
Figura 2	Mecanismos para instalação clínica do diabetes melito tipo 1.	30
Figura 3	Mecanismo de indução de eventos tóxicos em células β pela estreptozotocina (STZ)	35
Figura 4	Fluxograma para obtenção das amostras de sementes trituradas para processamento das análises	46
Figura 5	Processos para obtenção do óleo da semente da <i>A. muricata</i> .	48
Figura 6	Óleo extraído da semente da graviola após centrifugação.	48
Figura 7	Fluxograma de preparo da solução das sementes da graviola para avaliação antioxidante <i>in vitro</i> ..	50
Figura 8	Placa de cultura de esplenócitos exposta ou não a FLOsg com resazurina sódica após incubação <i>overnight</i> .	58
Figura 9	Protocolo experimental do modelo de diabetes melito tipo 1 e tratamento com o FLOsg.	62
Figura 10	Cromatoplaça da FLOsg, PtOsg e suas frações.	71
Figura 11	Cromatogramas do HPLC-DAD (215nm)do PtOsg e sua fração metanólica.	72
Figura 12	Estrutura química da anonacina.	73
Figura 13	Ensaio de viabilidade celular de esplenócitos <i>in vitro</i> .	74
Figura 14	Placa com sobrenadantes de cultura de sangue total exposta ou não a FLOsg com resazurina sódica após incubação <i>overnight</i> .	75
Figura 15	Curva de sobrevivência dos animais dos protocolos de toxicidade de doses repetidas <i>in vivo</i> do OsgB e FLOsg.	76
Figura 16	Análise da histopatologia hepática dos animais do protocolo OsgB de toxicidade <i>in vivo</i> de doses repetidas.	79
Figura 17	Análise da histopatologia hepática dos animais do protocolo FLOsg de toxicidade <i>in vivo</i> de doses repetidas. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola.	80

Figura 18	Análise da histopatologia renal dos animais do protocolo OsgB de toxicidade <i>in vivo</i> de doses repetidas.	82
Figura 19	Análise da histopatologia renal dos animais do protocolo FLOsg de toxicidade <i>in vivo</i> de doses repetidas.	83
Figura 20	Glicemia em jejum dos grupos dos animais do protocolo experimental do diabetes melito tipo 1.	84
Figura 21	Insulina sérica dos grupos dos animais do protocolo experimental do diabetes melito tipo 1.	85
Figura 22	Análise histopatológica do tecido pancreático dos animais do protocolo experimental do diabetes melito tipo 1.	86
Figura 23	Tecido hepático dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 corado por hematoxilina/eosina.	88
Figura 24	Tecido hepático dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 corado por tricrômio de Masson. FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola.	89
Figura 25	Tecido hepático dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 corado por ácido periódico de Shif (PAS).	90
Figura 26	Registro fotográfico dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1.	93
Figura 27	Dosagens das citocinas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1.	94
Figura 28	Comparação das dosagens <i>in vitro</i> de IFN- γ (pg/mL) em pacientes controles sem diabetes melitos (SDM), diabéticos altos produtores de IFN- γ (DM+) e baixos produtores de IFN- γ (DM-).	96
Figura 29	Comparação das dosagens <i>in vitro</i> de IFN- γ (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de sangue periférico de pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM).	97
Figura 30	Comparação das dosagens <i>in vitro</i> de IL-10 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de sangue periférico de pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM).	98
Figura 31	Comparação das dosagens <i>in vitro</i> de IL-10 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de sangue periférico de pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM).	98

Figura 32 Correlação entre dosagens de IFN- γ e IL-10 em culturas de sangue total dos pacientes diabéticos, não expostas a FLOsg.

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1	Composição centesimal (g%) das sementes da graviola <i>in natura</i> .	69
Tabela 2	Capacidade antioxidante <i>in vitro</i> da semente da graviola e FLOsg.	70
Tabela 3	Perfil de ácidos graxos da FLOsg por cromatografia gasosa (CG).	70a
Tabela 4	Parâmetros bioquímicos e físicos avaliados nos protocolos experimentais de toxicidade <i>in vivo</i> do OsgB e FLOsg.	78
Tabela 5	Parâmetros bioquímicos e físicos avaliados no protocolo experimental de diabetes melito tipo 1.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Micro
ω	Ômega
ABTS	Radical <i>(2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiaziline-6-sulfonate)</i>
AG	Ácido graxo
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
ALT	Alanina aminotransaminase
Anti-GAD	Anticorpo antiglutâmico descarboxilase (GAD)
Anti-IAA	Anticorpo anti-insulina
Anti-IA2	Anticorpo antitirosina fosfatase
AST	Aspartato aminotransaminase
ATP	Adenosina trifosfato
CYP	Ciclofosfamida
DM	Diabetes melito
DM1	Diabetes melito tipo 1
DM2	Diabetes melito tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil
FAME	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FLOsg	Fração líquida do óleo da semente da graviola
FRAP	Ferric reducing antioxidant power

g	Grama
GABA	Ácido gama aminobutírico
GAE	Ácido gálico equivalente
GPR40	Proteína de superfície da membrana
HbA1C	Hemoglobina glicada
HE	Hematoxilina/eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
IFN-γ	Interferon- γ
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-17	Interleucina-17
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
L	Litro
LADA	Diabetes autoimune latente em adultos
LC-ESI-MS	Cromatografia líquida por espectrometria de massa de ionização por <i>eletrospray-tandem</i>
MDA	Malondialdeído
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogénio
MIT	Mitocôndrias
MODY	<i>Maturity-Onset diabetes of the young</i>
MTT-tetrazólio	[(brometo de 4,5-dimetiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) 3-]
MUFA	Ácido Graxo Monoinsaturado

NF-kB	Fator nuclear kappa-B
NO	Óxido nítrico
NOD	Diabéticos não obesos
OMS	Organização Mundial da Saúde
Osg	Óleo da semente da graviola
PAS	Ácido Periódico de Shif
PG	Parkinsonismo guadalupeano
PtOsg	Precipitado do óleo da semente da graviola
PUFA	Ácido graxo poli-insaturados
SFA	Ácido graxo saturado
SPE	Extração em fase sólida
STZ	Estreptozotocina
TAE	Ácido tânico equivalente
TNF	Fator de necrose tumoral
TPTZ	Radical 2,4,6-tripiridil-s-triazina
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1	DIABETES MELITO TIPO 1 (DM1): CARACTERIZAÇÃO E FATORES DESENCADEANTES	27
2.2	DM1 E RESPOSTA IMUNOLÓGICA	29
2.3	MARCADORES DA AUTOIMUNIDADE: AUTOANTICORPOS NA DM1	32
2.4	TRATAMENTO DO DM1	32
2.5	MODELOS EXPERIMENTAIS: AÇÃO DA ESTREPTOZOTOCINA	33
2.6	PROPRIEDADES ANTIDIABÉTICAS DE PLANTAS E ÓLEOS VEGETAIS	36
2.7	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA <i>ANNONA MURICATA</i> L.	39
3	3 OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4	MÉTODO	45
4.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SEMENTES E ÓLEO DAS SEMENTES DA <i>A. MURICATA</i>	45
4.1.1	Preparo das amostras das sementes	45
4.1.2	Composição centesimal da semente	46
4.1.3	Extração do óleo	47
4.1.4	Quantificação de compostos fenólicos	48
	<i>Preparo do extrato da semente</i>	49
	<i>Método para quantificação de fenólicos totais</i>	49
4.1.5	Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> das sementes e FLOsg	49
	<i>Preparo dos extratos das sementes e FLOsg</i>	49
	<i>Método DPPH</i>	50
	<i>Método ABTS</i>	51
	<i>Método FRAP</i>	52
4.1.6	Determinação do perfil de ácidos graxos	52
4.1.7	Análise da presença de acetogeninas no óleo das sementes da graviola	54
	<i>Preparo das amostras</i>	54
	<i>Perfis cromatográficos</i>	54

4.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO OsgB E FLOsg	55
4.2.1	Ensaio de citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	55
	<i>Viabilidade celular por MTT-tetrazólio</i>	55
	<i>Viabilidade celular por Resazurina sódica</i>	56
	Viabilidade por Resazurina sódica em esplenócitos murino	57
	Viabilidade por Resazurina sódica em células de sangue total humano	58
4.2.2	Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> de doses repetidas do OsgB e FLOsg	59
	<i>Protocolo experimental de toxicidade <i>in vivo</i></i>	59
	Análises físicas	60
	Análises histopatológicas	60
	Análises bioquímicas e hematológica	60
4.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES DA FLOSG EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELITO TIPO 1	61
4.3.1	Protocolo experimental de diabetes melito tipo 1	61
	<i>Grupos experimentais</i>	62
	<i>Análises físicas</i>	63
	<i>Dosagem de glicemia e insulina sérica</i>	63
	<i>Parâmetros bioquímicos</i>	63
	<i>Análises histopatológicas</i>	64
	<i>Ensaio <i>in vitro</i> da produção de citocinas (IL-10, IL-17, IL-4)</i>	64
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR <i>IN VITRO</i> DA FLOSG EM CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DM1	65
4.4.1	Seleção de indivíduos e coleta de amostras de sangue periférico humano	65
4.4.2	Cultura de sangue total e dosagens de citocinas	66
4.5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	66
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	67
5	RESULTADOS	69
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SEMENTES E ÓLEO DAS SEMENTES DA GRAVIOLA	69
5.1.1	Composição centesimal da semente	69
5.1.2	Quantificação de compostos fenólicos	69
5.1.3	Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> das sementes e FLOsg	70
5.1.4	Determinação do perfil de ácidos graxos	70

5.1.5	Análise de compostos no óleo bruto das sementes da graviola	71
5.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA FLOsg E TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO OsgB E A FLOsg	73
5.2.1	Ensaio de citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	73
5.2.2	Viabilidade por Resazurina sódica em células de sangue total humano	73
5.2.3	Avaliação da toxicidade de doses repetidas <i>in vivo</i> do OsgB e FLOsg	75
	<i>Avaliação da sobrevivência dos animais</i>	75
	<i>Análises físicas, bioquímicas e hematológica</i>	76
	<i>Análises histopatológicas</i>	77
	Análises hepáticas	77
	Análises renais	81
5.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES DO FLOSG EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELITO TIPO 1	84
5.3.1	Dosagem de glicemia e insulina sérica	84
5.3.2	Análises histológicas	85
	<i>Análises pancreáticas</i>	86
	<i>Análises hepatológicas</i>	87
5.3.3	Parâmetros bioquímicos e físicos	91
5.3.4	Ensaio <i>in vitro</i> de produção de citocinas (il-10, il-17, il-4)	93
5.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR <i>IN VITRO</i> DO FLOSG EM CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DM1	94
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICES	140
	APÊNDICE A - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	141
	APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	143
	ANEXOS	145
	ANEXO A - Certificado	146
	ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP	147
	ANEXO C - Certificação de Aprovação	150

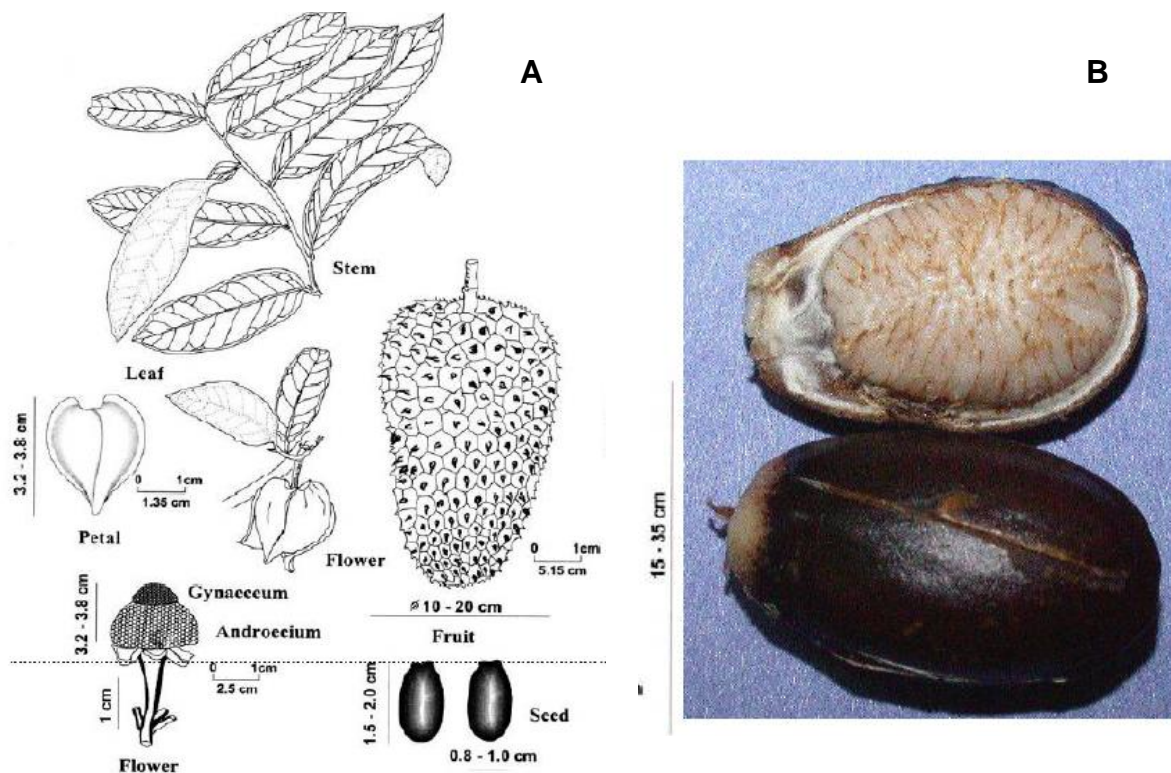
1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O estudo do bioma brasileiro constitui-se em uma importante ferramenta para a comprovação científica de práticas populares sobre o uso de plantas e espécies vegetais regionais e para o desenvolvimento de novos fármacos, que visem ao baixo custo na preparação e à eficácia terapêutica.

Grande número de espécies frutíferas tem atributos suficientes para serem aproveitadas comercialmente, seja por meio dos próprios frutos ou de sementes de excelente qualidade (ALMEIDA, 2008). A angiosperma *Annona muricata* L., da família Annonaceae, é uma árvore subespontânea na Amazônia, de clima úmido e baixa altitude, encontrada em florestas tropicais (CHIARATTI, 2008). É originária das terras baixas da América Tropical, mais precisamente da América Central e dos vales peruanos. Seu fruto é conhecido popularmente como graviola e apresenta formato ovalado, casca verde-pálida, com peso variando entre 0,4 a 10 Kg (Figura 1) (FRANZÃO; MELO, 2007).

Figura 1 - Características vegetais da *A. muricata*.



Fonte: Chiaratti (2008).

Legenda: A) Estruturas vegetais da *A. muricata*. B) Registro fotográfico da semente da *Annona muricata* L.

A gravioleira é uma árvore de grande importância na região quente e semiárida do Nordeste, em razão da boa adaptação da planta às condições climáticas da região (NOGUEIRA et al., 2005). A graviola é uma das frutas tropicais brasileiras de maior aceitação comercial no mercado nacional. A comercialização como fruta fresca atingiu 52 toneladas no ano de 2011, cerca 350% acima do volume comercializado no ano de 2005, segundo dados da Central de Abastecimento de Salvador (EMPRESA BAHIANA DE ALIMENTOS, 2011).

O estado da Bahia, Brasil, é considerado o maior produtor mundial de graviola e produz cerca de 8 mil toneladas de frutas por ano. A fruta é utilizada nas indústrias de processamento na produção de sucos de fruta e polpas (AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DA BAHIA, 2011), o que resulta numa quantidade de sementes que são descartadas e não utilizadas comercialmente, já que uma fruta pode conter até 200 ou mais sementes (ENCINA, 2005). Tais estruturas da planta podem se constituir em ingredientes nutricionais ou farmacêuticos que podem ser explorados em estudos científicos, tanto pela riqueza em nutrientes agregando qualidade à dieta, como pela presença de compostos com propriedades funcionais. Algumas propriedades biológicas dos extratos das folhas da *A. muricata* já foram identificadas na literatura científica, a exemplo da sua ação antidiabética (ADEYEMI et al., 2009; ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; FLORENCE et al., 2014), podendo ser utilizada como recurso alternativo para a terapêutica do diabetes melito, especialmente visando à melhoria do controle metabólico e dos processos inflamatórios inerentes a esse distúrbio.

Diabetes melito (DM) é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente (diabetes tipo 1 ou DM1) ou quando o organismo apresenta distúrbio de receptor, no qual não utiliza adequadamente a insulina secretada ou apresenta relativa deficiência de insulina com resistência a ela (diabetes tipo 2 ou DM2). Outros tipos classificados, conforme a origem, são o diabetes gestacional e aqueles oriundos de defeitos genéticos, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias e os induzidos por drogas ou infecções (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). Além destes, existe um subtipo de diabetes MODY – *Maturity-Onset Diabetes of the Young* – que corresponde a um defeito primário na secreção da insulina, associado à disfunção na célula β pancreática. Esse subtipo se manifesta precocemente, geralmente em pessoas abaixo de 25 anos e com transmissão autossômica dominante (determinada em pelo menos três

gerações). Apresenta heterogeneidade e se classifica em outros subtipos, tais como: MODY 1, MODY 2, MODY 3, MODY 4, MODY 5 e MODY 6 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

A hiperglicemia é um efeito comum do DM descontrolado e, ao longo do tempo, leva a sérias consequências, especialmente no sistema nervoso e circulatório (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a). Além dos sintomas característicos, como poliúria, polidipsia, perda de peso por vezes com polifagia, visão turva e susceptibilidade a infecções, a hiperglicemia e as disfunções metabólicas do DM levam a alterações estruturais em sistemas como a macroangiopatias (doença coronariana e insuficiência arterial) e microangiopatias (retinopatia, nefropatia e neuropatia) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Estudo de prevalência do DM revela que há cerca de 347 milhões de pessoas no mundo acometidas por essa doença (DANAIEI et al., 2011). Mais de 80% das mortes por DM ocorrem em países de baixa e média renda (MATHERS; LONCAR, 2006). A Organização Mundial da Saúde – OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013b) estima que o DM será a sétima principal causa de morte em 2030.

Os recursos medicamentosos no tratamento do DM, como a insulina exógena e os hipoglicemiantes orais, são empregados de acordo com a incapacidade do controle glicêmico, além de mudanças comportamentais e do estilo vida, como adoção de plano dietético e atividade física (ASSUNÇÃO et al., 2002).

A prevenção das complicações e a morbidade no DM é uma estratégia relevante da Saúde Pública para a diminuição da mortalidade (BRASIL. Ministério da Saúde, 2006). O tratamento apresenta custo elevado e é bastante complexo, especialmente quando se considera as mudanças intensas e radicais na rotina, como a administração diária da insulina e o monitoramento constante da glicemia. Nesse contexto, é vantajosa a utilização de terapias alternativas, como o uso de plantas medicinais para o tratamento ou controle da doença.

Alguns estudos apontam efeitos biológicos, oriundos da interação metabólica dos ácidos graxos no organismo humano, bem como de outros constituintes bioativos em plantas medicinais, como hipoglicemiantes, estimulantes da secreção da insulina e de seus receptores ou com efeitos extrapancreáticos, como melhor utilização metabólica da glicose, favorecendo o controle do diabetes (GRAY; FLATT, 1999; ABDEL-HASSAN et al., 2000; NEGRI, 2005).

Embora a ação antidiabética de extratos das partes aéreas e frutos da *A. muricata* já tenha sido investigada (ADEYEMI et al., 2009; ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; FLORENCE et al., 2014), informações sobre a composição, valor nutricional e usos medicinais das sementes da fruta graviola e óleo extraído das sementes, ainda são limitadas, especialmente explorando suas propriedades farmacológicas, com possíveis efeitos imunomoduladores em DM1, compondo assim o principal interesse científico do presente estudo.

A bioprospecção, isto é, “[...] o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local” (SANTOS, 2012), permite identificar potenciais recursos naturais que podem auxiliar na terapêutica de muitas doenças. Considerando o aproveitamento sustentável das sementes da graviola, praticamente subutilizadas, associado à ausência de dados científicos sobre as propriedades biológicas, pretende-se, com o desenvolvimento deste trabalho obter dados que viabilizem estudos futuros acerca da utilização e da aplicação das sementes como potencial agente terapêutico para o tratamento do DM1, visando a melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

2 Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Apresentam-se, a seguir, os fundamentos teóricos que deram embasamento a esta pesquisa.

2.1 DIABETES MELITO TIPO 1 (DM1): CARACTERIZAÇÃO E FATORES DESENCADEANTES

O DM1 é caracterizado pela destruição das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, células estas produtoras da insulina, e normalmente leva à deficiência absoluta da insulina. Pode ter origem imunomediada ou idiopática (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

A forma idiopática não tem etiologia conhecida. Os pacientes podem apresentar insulinopenia permanente e são propensos à cetoacidose, sem evidência de autoimunidade. Uma minoria dos pacientes com DM1 se enquadra nessa forma e, geralmente, são de ascendência africana ou asiática (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O DM1 autoimune é uma doença crônica causada pela destruição das células β por linfócitos T autorreativos e se manifesta predominantemente em crianças, adolescentes e adultos jovens (70% antes dos 35 anos), causando importantes morbidades e mortalidade (VOLTARELLI, 2004). O diagnóstico do DM1 ocorre também predominantemente em duas faixas etárias: 5-7 anos e na puberdade (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). O diabetes autoimune diagnosticado na fase adulta é conhecido como diabetes autoimune latente em adultos (LADA), sendo caracterizado por uma progressão mais lenta de perda de células β e das necessidades de insulina, além de resistência mais intensa à insulina. Os indivíduos afetados pela LADA muitas vezes são erroneamente diagnosticados como DM2 (REDONDO, 2013).

De todos os casos de diabetes melito, o DM1 representa 5-10% (PETTITT et al., 2014). A incidência geográfica varia entre 0,1 e 60 casos por 100 mil habitantes, no entanto, casos subdiagnosticados também devem ser considerados, visto que pacientes DM2 podem apresentar comprometimento imunológico (ATKINSON; EISENBARTH, 2014). Alguns exemplos de taxas de incidência podem ser citados como 38,4 na Finlândia, 7,6 no Brasil e 0,5 na Coreia, para cada 100 mil habitantes.

Sabe-se que, particularmente na população com menos de 5 anos de idade, essa incidência vêm aumentando (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2013).

Os mecanismos precisos envolvidos na iniciação, progressão e destruição autoimune das células β ainda estão sendo explorados. Diversos fatores estão implicados, dentre esses, os genéticos, imunológicos e ambientais (ONENGUT-GUMUSCU; CONCANNON, 2002). Geralmente, ocorre em indivíduos com predisposições genéticas e manifesta-se pela ação de fatores ambientais, como as infecções virais (ODEGAARD; CHAWLA, 2012). Esses fatores atuam como um “gatilho” durante a fase pré-clínica e interagem com genes de susceptibilidade para DM1 (Figura 1) (KNIP; SIMELL, 2012), sendo mais importantes os genes situados no *locus* de HLA-DQ (POCIOT et al., 2010).

De todas as crianças nascidas, 30% apresentam risco genético para o DM1 (MEJÍA-LEÓN; RUIZ-DYCK; CALDERÓN DE LA BARCA, 2015). Uma pequena parte dos indivíduos geneticamente susceptíveis progride para a doença clínica e isso implica que fatores adicionais são necessários para desencadear a doença em indivíduos predispostos (KNIP; SIMELL, 2012).

Especula-se que fatores como infecções virais, fatores nutricionais e inflamação intestinal podem contribuir para o processo pró-inflamatório (KNIP; SIMELL, 2012).

Existe uma interação complexa entre a microbiota intestinal, a permeabilidade do intestino e a imunidade da mucosa, o que pode ser um fator promotor da resposta autoimune (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008; ATARASHI et al., 2011).

Os vírus, como os enterovírus, podem atuar por meio de um efeito citolítico direto ou por disparo de um processo autoimune, além do mimetismo molecular por homologia estrutural entre as estruturas virais e antígenos de células β (HONEYMAN, 2010; KNIP; SIMELL, 2012).

A autoimunidade das células β pode ser induzida durante o primeiro ano de vida e o tipo da nutrição precoce proporciona exposições a exógenos essenciais (KNIP; VIRTANEN; AKERBLUM, 2010). Estudos apontam que um curto período de amamentação ou exposição precoce à proteína do leite da vaca e o consumo de cereais podem aumentar o risco para o aparecimento de sinais de autoimunidade das células β (KIMPIMÄKI et al., 2001; NORRIS et al., 2003).

2.2 DM1 E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Dentre os componentes imunológicos implicados na patogenia do DM1, destacam-se os linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), os linfócitos B (FERNANDES et al., 2005; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011), as células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, a participação de autoanticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas, as citocinas pró-inflamatórias, além das moléculas do complexo de histocompatibilidade (HLA) e das moléculas coestimulatórias (Figura 1) (FERNANDES et al., 2005).

Fisiologicamente, as células T, com uma elevada afinidade para autoantígenos, são normalmente eliminadas durante sua diferenciação, por meio de mecanismos centrais de tolerância imunológica. Ainda assim, células autorreativas, que escapam desse mecanismo, sofrem bloqueio da sua ativação e expansão clonal, por mecanismo conhecido como regulação imune periférica, o que impede o desenvolvimento da doença autoimune. No DM1 autoimune, esses mecanismos de regulação são ineficazes e é estabelecido o ataque contra as células β das ilhotas pancreáticas (MATHIS; BENOIST, 2004).

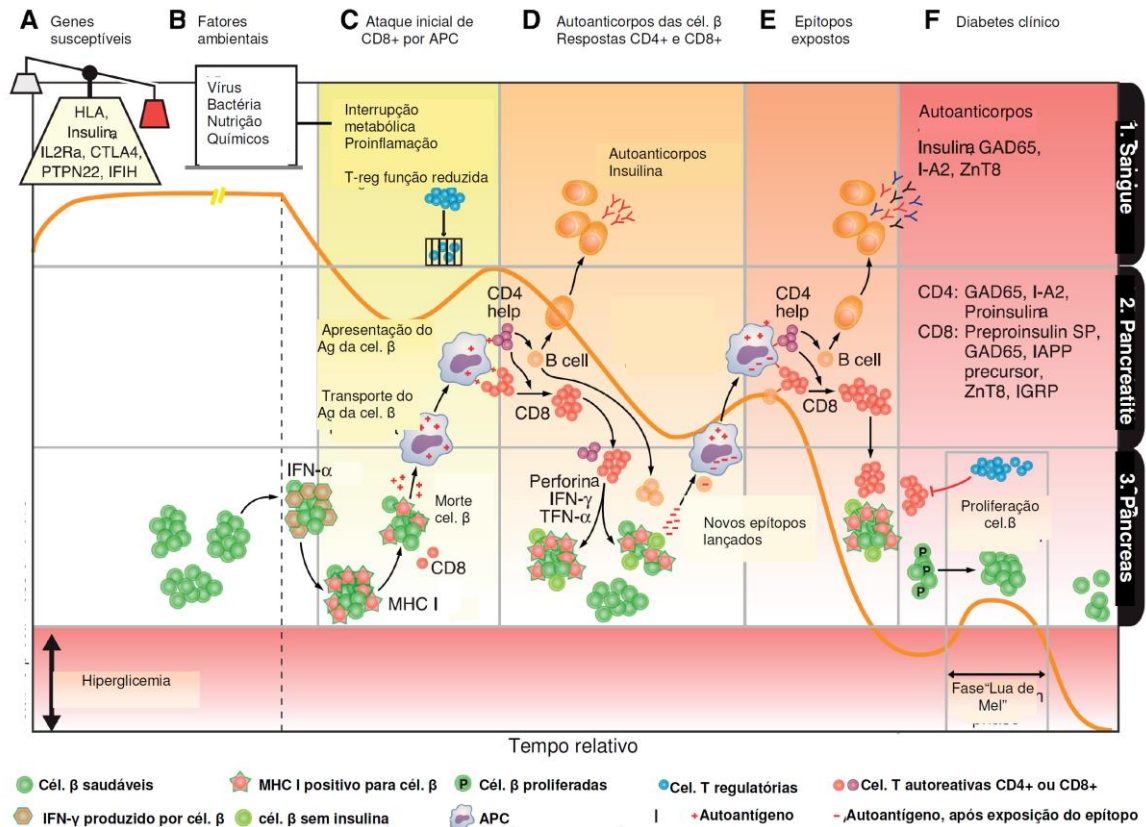
O desenvolvimento pancreático normal é interferido por deficiências em células do sistema imunológico. Alterações em populações de células linfócitos T $CD8^+$ $CD28^+$ supressores e defeitos na função dos linfócitos que conduzem a perturbações nos canais de potássio, foram identificados em pacientes com DM1 (MIKULKOVA et al., 2010; TOLDI et al., 2010).

Os macrófagos que se infiltram promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina- 1β (IL- 1β), o fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ), bem como várias quimiocinas que atraem células imunitárias, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos T. Estes reconhecem antígenos específicos de células β e são ativados, culminando com a infiltração e ataque às células (Figura 1) (LIEBERMAN et al., 2003, NAKAYAMA et al., 2005).

As células T $CD8^+$ têm um papel proeminente na DM1, visto que, em protocolos animais, camundongos NOD (diabéticos não obesos), deficientes nessas células, não apresentaram a autoimunidade (KATZ; BENOIST; MATHIS, 1993), são reconhecidas como o mais importante promotor da morte das células das ilhotas, devido às suas propriedades citotóxicas (WILLCOX et al., 2009).

As células T CD4+ autorreativas também exercem importância na patogenia do diabetes por produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF, as quais contribuem para destruição das células β (VARANASI et al., 2012), além também de recrutarem células T CD8+ (CASARES; BRUMEANU, 2001).

Figura 2 - Mecanismos para instalação clínica do diabetes melito tipo 1



Fonte: Baseado em Van Belle e colaboradores (2011)

Legenda: Linha laranja: função e massa das células β ; colunas em ordem alfabética: fases imunológicas; linhas com guia numérico à esquerda: o que ocorre em locais anatômicos.

As células T ativadas induzem a morte celular por três mecanismos: 1) secretam enzimas perforinas e granzimas; 2) liberam citocinas inflamatórias; e 3) ativam receptores Fas na superfície das células alvo (SUK et al., 2001; PETROVSKY et al., 2002).

As perforinas agem formando orifícios na membrana plasmática de células das ilhotas, permitindo que as granzimas, proteases citotóxicas de serina, induzam a morte celular por apoptose e necrose (PODACK et al., 1988).

As citocinas inflamatórias aumentam o estresse oxidativo celular e a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como os receptores Fas, o que induz as

células β a entrar em apoptose (STASSI et al., 1997); também conduzem e estabelecem a resposta autoimune por ativar a secreção de quimiocinas pelas células β , como as CXCL9 e CXCL10 (FRIGERIO et al., 2002).

A IL-1 β ativa a proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK), induz processos regulados pelo fator nuclear kappa-B (NF-kB) e ativa a óxido nítrico sintase (iNOS) (LARSEN et al., 2005). TNF- α e IFN- γ , de forma sinérgica, ativam os canais de cálcio, o que leva à disfunção mitocondrial e ativação de caspases. O IFN- γ também conduz a apoptose celular por indução de processos regulados pelo fator de transcrição STAT-1 (CNOP, 2005; EIZIRIK; MIANI; CARDOZO, 2013). Além das citocinas de padrão Th1, a IL-17 também parece estar envolvida no processo de doenças autoimunes, por meio do aumento da expressão das quimiocinas pró-inflamatórias em células pancreáticas e, dessa forma, promove a autoimunidade (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007; GRIECO et al., 2013).

O início clínico do DM1 é assintomático e acompanhado por insulite, ou seja, presença de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas por mecanismos celulares (KATZ, 1995). O processo de morte celular é contínuo e progressivo. A doença se manifesta quando mais de 80% das células são destruídas e a produção da insulina se encontra insuficiente para atender à demanda metabólica. (SUK et al., 2001; PETROVSKY et al., 2002).

A fase Lua de Mel é um período de restauração transiente da função da célula beta, após o início da terapêutica com insulina, caracterizando um bom controle metabólico e diminuição da dependência da insulina exógena. É uma fase potencial para intervenção com drogas, cujo objetivo é parar o processo de destruição das células β (ABDUL-RASOUL; HABIB; AL-KHOULY, 2006).

Os indivíduos com risco aumentado de desenvolvimento desse tipo de diabetes podem ser identificados por detecção de marcadores genéticos e testes sorológicos do processo autoimune (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Com o aparecimento de autoanticorpos, o risco para DM1 aumenta em até 75% dentro de 10 anos e a instalação da doença é muito provável dentro de 20 anos, após o início da ação dos autoanticorpos (SIMMONS; MICHELS, 2014). Sendo assim, estratégias que visem à prevenção dos processos desecandentes e de progressão do DM são de extrema importância. As prevenções podem ser pautadas em: primária, antes de soroconversão; secundária, visando a prevenir ou

retardar o aparecimento DM1, quando a autoimunidade das células β já está presente; e terciária, para evitar complicações do DM1 instalado (SKYLER, 2015).

2.3 MARCADORES DA AUTOIMUNIDADE: AUTOANTICORPOS NO DM1

Uma variedade de autoanticorpos específicos contra os antígenos das células β tem sido utilizada como marcador da presença da autoimunidade contra as ilhotas pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Marcadores da destruição imunológica das células β incluem autoanticorpos antipeptídeos de células β , anti-insulina, antiGAD (GAD65) e antitirosina fosfatases IA-2 e IA-2b. Quando o processo de hiperglicemia em jejum é iniciado, um ou mais desses autoanticorpos estão presentes em 85-90% dos indivíduos. Dentre os marcadores genéticos estão relacionados o HLA, com ligação aos genes *DQA* e *DQB*, influenciado pelos genes *DRB* (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Autoanticorpos anti-insulina (IAA) são detectados em cerca de 50% dos pacientes diabéticos, recentemente diagnosticados, sendo mais comuns entre crianças do que entre jovens e adultos (LIU; EISENBARTH, 2002).

O principal autoantígeno na patogenia da DM1 é o ácido glutâmico descarboxilase (GAD). O GAD é uma enzima que catalisa a formação do ácido gama aminobutírico (GABA), transmissor neuroinibidor do Sistema Nervoso Central, sintetizado a partir do L-glutamato. O anticorpo inibe a produção da enzima e, na célula beta pancreática, a adenosina trifosfato (ATP). Duas formas são reconhecidamente expressas nos tecidos humanos: GAD65 e GAD67. Anticorpos antiGAD65 são detectados em cerca de 50 a 80% dos pacientes recentemente diagnosticados (WOO et al., 2000).

2.4 TRATAMENTO DO DM1

A descoberta da ação da insulina como hipoglicemiante foi em 1922 e, à época, foi considerada uma das maiores descobertas médicas de então (BALEY; DAY, 1989).

O tratamento com insulina, na maioria das pessoas com DM1, deve ser por meio de injeções com doses múltiplas de insulina basal e prandial ou por infusão contínua de insulina subcutânea. A terapia nutricional de contagem de carboidratos

deve ser associada ao uso da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

A utilização da insulina exógena não leva à cura do DM e quando persiste o descontrole glicêmico não diminuem os riscos das complicações, como as micro e macroangiopatias. Outro possível efeito dessa terapêutica é a hipoglicemia noturna, a qual deve ser evitada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015). Sendo assim, a procura de novas formas de tratamento tem como foco diminuir as comorbidades e a dependência do uso da insulina.

Algumas terapias aprovadas para o tratamento do DM2 estão sendo avaliadas atualmente para o DM1. A utilização da metformina, associada à terapia insulínica, tende a reduzir as necessidades da insulina, porém, alguns estudos apontam que não promove o controle glicêmico (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Outros tipos de terapias com anticorpos neutralizantes vêm sendo estudados, como a administração de antagonista de receptores da IL-1 β ou que reprimam o NF- κ B e a expressão da iNOS, constituindo-se em formas para melhorar a proteção do pâncreas e diminuir a apoptose das células β (BÖNI-SCHNETZLER, 2009; MORAN et al., 2013).

Essas formas de busca por alternativa terapêutica em diabetes podem ser desenvolvidas em protocolos experimentais imunomoduladores. A busca de novos fármacos, como os oriundos de espécies vegetais que apresentem benefícios em relação à capacidade anti-inflamatória e como imunoterápicos, com mínimos efeitos colaterais, torna-se uma estratégia vantajosa para o controle dessa doença crônica.

2.5 MODELOS EXPERIMENTAIS: AÇÃO DA ESTREPTOZOTOCINA

Os modelos experimentais mais utilizados em roedores para o estudo do diabetes envolvem a administração de aloxano ou estreptozotocina (STZ) (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

Após o primeiro relato da capacidade da estreptozotocina em induzir diabetes em 1963 (RAKIETEN et al., 1963), ela tem sido usada extensivamente em modelos animais para estudar tanto a patologia do diabetes, como as morbidades e possíveis intervenções terapêuticas para esta enfermidade (DEED BALDA S et al., 2011).

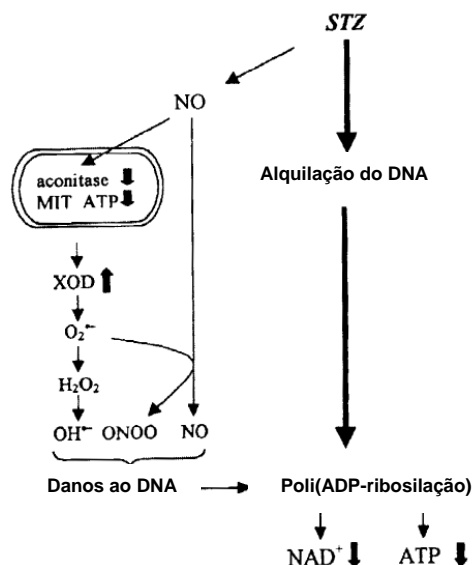
A estreptozotocina (STZ) (2-desoxi-2-(3-(3-metil-nitrosoureido)-D-glucopiranoose) é um glicosídeo nitroso natural, isolado da bactéria *Streptomyces achromogenes*, que estimula a produção de radicais livres e leva à destruição e disjunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (DEEDS et al., 2011).

A STZ entra na célula através do transportador GLUT2 e procede a alquilação de DNA e, conseqüentemente, a morte das células β . A ação tóxica não é específica para essas células, sendo assim, essa ação pode provocar dano a outros tecidos, como fígado e rim (LENZEN, 2008; IMAEDA et al., 2002; ELSNER et al., 2000).

Dois mecanismos associados a essa destruição parecem ser:

- a) Um mecanismo citotóxico favorecido pelo óxido nítrico (NO), no qual a exposição à STZ induz um impedimento da síntese de DNA (HOLEMANS et al., 1997; IMAEDA et al 2002), oriundo da produção de espécies reativas de oxigênio, por um mecanismo de alquilação das bases nitrogenadas em vários níveis, as quais, quando reparadas, causam alterações letais nas células β . A STZ inibe o ciclo de Krebs e diminui o consumo de oxigênio nas mitocôndrias, conseqüentemente limita o ATP mitocondrial, causando disjunção nas células β (Figura 3) (TURK et al., 1993);
- b) Um mecanismo autoimune, sendo que múltiplas injeções de STZ, em baixas a moderadas doses, estimulam a formação de neoantígenos nas ilhotas pancreáticas, por um efeito direto nas proteínas das células β ou por resultado de reparação de DNA nessas células, induzindo uma resposta imune destrutiva e caracterizando, dessa forma, o mecanismo autoimune (WEIDE; LACY, 1991).

Figura 3 - Mecanismo de indução de eventos tóxicos em células β pela estreptozotocina (STZ).



Fonte: Adaptado de Szkudelski (2001).

Legenda: MIT - mitocôndrias; XOD - xantina oxidase.

A necrose das células β em ratos injetados com STZ é detectada logo após 2-4h da sua administração, enquanto que a infiltração de leucócitos é evidente apenas após 3-4 dias (LIKE; ROSSINI, 1976).

A STZ tanto pode estimular o DM1, quanto o DM2. Várias metodologias de indicação de doses de STZ em protocolos experimentais podem ser encontradas na literatura, dependendo do tipo e gravidade do diabetes proposto pelo estudo. A STZ administrada em baixas doses múltiplas é utilizada, predominantemente em camundongos, para induzir o DM1 pela ativação de mecanismos imunes. Dose única e moderada tende a induzir um DM lentamente progressivo, como o DM2, enquanto que uma alta dose e única é capaz de induzir um DM altamente tóxico às células β , com destruição quase total e com mensuração mínima de insulina (ITO et al., 1999).

Estima-se que com uma dose de 60mg/kg de STZ, por 5 dias, pode ser iniciado um processo autoimune que resulta na destruição das ilhotas de *Langerhans*, resultando na toxicidade das células β , com surgimento do DM clínico dentro de 2-4 dias (AKBARZADEH et al., 2007; AL GHAMDI et al., 2015). Cerqueira-Lima e colaboradores (2014) padronizaram um modelo experimental de diabetes, caracterizado pela destruição das células β , com a utilização da dose de STZ a 100mg/Kg, por 3 dias consecutivos, via intraperitoneal, em camundongos machos

BALB/c. Nesse modelo, foi observada a atrofia das ilhotas dos animais diabéticos em relação aos controles. A atrofia das ilhotas é característica do DM clínico instalado em modelos animais (IN'T VELD, 2014).

A maioria dos estudos sobre a etiopatogenia do DM1 é realizada em roedores, principalmente em camundongos diabéticos não obesos (NOD), que apresentam semelhanças genéticas e imunológicas com o DM1 humano, apesar da histopatologia da ilhota pancreática ser diferente (IN'T VELD, 2014).

Em humanos, a insulite (presença de infiltrado inflamatório ao redor das ilhotas) é transitória e, geralmente, apenas observada em pacientes com diagnóstico recente. Gepts (1965) identificou que a insulite não está presente em pacientes com mais de um ano da doença diagnosticada e que há uma redução de 10% na massa de células β em relação a indivíduos controles, caracterizando uma ilhota atrofica e com infiltrado de células imunológicas. Esses achados culminaram na classificação autoimune do DM1.

Em modelos de camundongos NOD, a resposta inflamatória é intensa, a insulite ocorre em todas as ilhotas e há uma maior perda de células β , com maior atrofia e, nessa última fase, o diabetes clínico é instalado (IN'T VELD, 2014).

2.6 PROPRIEDADES ANTIDIABÉTICAS DE PLANTAS E ÓLEOS VEGETAIS

Anteriormente ao uso dos hipoglicemiantes orais e insulina exógena, a utilização de plantas medicinais era a principal forma de controle do DM, pela riqueza em substâncias bioativas e terapêuticas (GRAY; FLATT, 1999). Os primeiros relatos de utilização das plantas para o tratamento do DM data do Papiro Ebers (1937), em 1.550 a.C., que recomendava uma dieta rica em fibras de grãos de trigo e ocre.

A atividade antidiabética de várias ervas e especiarias vem sendo compilada e descrita em todo o mundo (BALEY; DAY, 1989; VOLPATO et al., 2002; LI et al., 2004; NEGRI, 2005; DORNAS et al., 2009). Esses produtos naturais podem apresentar mecanismos, tais como o aumento da liberação de insulina, inibição de fatores hiperglicemiantes, inibição ou estímulo da síntese de enzimas ou, ainda, amenizando demais complicações do diabetes, como a resposta inflamatória. Dentre os compostos ativos utilizados para o controle do diabetes, destacam-se: polissacarídeos, esteroides, terpenoides, alcaloides, flavonoides, glicosídeos,

triterpenos, vitaminas, saponinas, proteínas, peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos (ABDEL-HASSAN et al., 2000).

Os óleos vegetais apresentam, de forma geral, riqueza em ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos atuam como reguladores da resposta inflamatória, pois seus análogos precursores são estruturalmente relacionados às prostaglandinas e podem servir como inibidores competitivos da sua formação, inibindo a cascata de reações a partir das cicloxigenases e de produtos da lipoxigenase (LIMA et al., 2005).

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com seu grau de saturação: saturados (SFA), a exemplo o ácido palmítico (C16:0), insaturados, sendo divididos em monoinsaturados (MUFA), a exemplo o ácido oleico ômega 9 (C:18:1), e poliinsaturados (PUFAs), a exemplo os ácidos linoleico ômega 6 (C18:2 n-2) e linolênico ômega 3 (C18:3 n-3) (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Os ácidos graxos ômega 3 estão relacionados com desvio da cascata inflamatória, por diminuir formação do ácido araquidônico, formando nesse processo o ácido ecosapentaenoico (EPA) (C20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA) (C22:6 n-3). Esse desvio parece ocorrer apenas quando há ingestão proporcional adequada de ácido linoleico ômega-6 e ácido linolênico ômega 3, na razão, respectivamente, de 5:1 (COZZOLINO, 2007).

Os mecanismos específicos, nos quais os ácidos graxos insaturados exercem suas propriedades terapêuticas, são bastante variados. A composição de ácidos graxos da membrana celular é um sistema dinâmico e os mecanismos de regulação e compreensão de como agem no organismo humano não estão totalmente esclarecidos.

Os ácidos graxos ômega 3 alfa-linolênico (C18:3 n-3) apresentam forte ação anti-inflamatória e antitrombótica e estão relacionados com a melhoria da sensibilidade à insulina. Além disso, muitos estudos apontam que a interação entre ingestão de PUFA e MUFA pode influenciar a resistência à insulina, sensibilidade à insulina e níveis de glicose plasmática em jejum, em vários tipos de populações. Dentre esses mecanismos, está envolvida a composição de ácidos graxos dos fosfolipídios do músculo esquelético, que tem sido relacionada à resistência periférica da insulina e obesidade, fatores associados ao DM2 (OLALLA; MUNIZ; VAQUERO, 2009).

Torres, Noriega e Tovar (2009) avaliaram os efeitos *in vitro* de ácidos graxos sobre a função e sobrevivência das células β e observaram que essas células

podem responder à ação de ácidos graxos sobre a transcrição e transdução de sinais, promovendo sua função e sobrevivência. Outros modelos de exposição aguda das células β a ácidos graxos apoiam a hipótese de amplificação da secreção de insulina, por modulação do metabolismo da glicose (LÓPEZ et al., 2010).

O ácido graxo pode apresentar capacidade de induzir a secreção da insulina, aumentando essa capacidade conforme o comprimento da cadeia e diminuindo, quando há insaturação. Como exemplo, o monoinsaturado ácido oleico (C18:1) apresenta metade da indução insulínica do ácido saturado palmítico (C16:0). No entanto, a exposição aguda ao ácido oleico em células de rato com insulinoma promoveu aumento da secreção da insulina e diminuiu ação inibitória do TNF (VASSILIOU et al., 2009), ainda havendo contradições relacionadas a essa dinâmica. A secreção da insulina pode ser mediada por processos metabólicos ativados, quando os ácidos graxos atingem o citoplasma e/ou ligam-se a receptores G de superfície celular acoplado à proteína (GPR40), definidos como receptores de ácidos graxos livres (NOLAN et al., 2006).

O potencial efeito terapêutico dos MUFA e, especialmente, do ácido graxo oleico, em um contexto inflamatório, já foi previamente avaliado. O ácido oleico promoveu aumento da secreção de insulina *in vitro*, em linhagens de células INS-1, sensíveis à glicose, mesmo quando as células foram expostas à citocina TNF, sendo esta inibidora da insulina. Os autores discutem que o ácido oleico ativou o receptor de peroxissomo proliferativo (PPAR- γ) o qual apresenta ação anti-inflamatória e pode estar envolvido no mecanismo molecular que inverteu a inibição da insulina pelo TNF (VASSILIOU et al., 2009).

Os monoinsaturados desempenham um papel importante no tratamento padrão do diabetes e apresentam potencial para atuar como reguladores da homeostase da glicose, no período interdigestivo ou pós-absortivo (LÓPEZ et al., 2010). A exposição das células β ao ácido palmítico, em longo prazo, reduziu a transcrição do gene da insulina e promoveu apoptose dessas células, enquanto o ácido oleico, citoprotetor, atenuou os efeitos pró-apoptóticos do palmítico (MORGAN et al., 2008; MORGAN et al., 2009). No entanto, esses mecanismos antagônicos ainda não estão totalmente esclarecidos.

Além da ação dos ácidos graxos presentes em óleos vegetais, muitas atividades biológicas descritas cientificamente em plantas são, em parte, atribuídas a um grupo de moléculas com estrutura química derivada do benzeno, denominadas polifenóis

ou compostos fenólicos, podendo ser classificados em famílias como flavonoides, ácidos fenólicos, lignanas e estilbenos (COZZOLINO, 2004; DAMODARAN et al, 2010). Dentre eles, os taninos, ou ácido tânico, se destacam em variadas frutas e apresentam função de proteção ao tecido vegetal (EFRAIM et al., 2006).

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes no reino vegetal (EVERETTE et al., 2010) e apresentam potencial anti-inflamatório, antibiótico, antialérgico e inibidor da proliferação celular, além de seus efeitos de sequestrar espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (COZZOLINO, 2004; DAMODARAN et al, 2010).

Os radicais livres são moléculas instáveis e com grande capacidade reativa (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A atividade metabólica do organismo contribui para a formação desses espécies, os quais, por sua atividade oxidante, podem contribuir para a frequência e a prevalência de doenças degenerativas e de envelhecimento celular (MELO et al., 2006). O estresse oxidativo pode ser resultante de um aumento na produção desses radicais e, conseqüentemente, um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (SIES; STAHL, 1995).

Segundo Sies e Stahl (1995), antioxidante é uma substância que atrasa ou inibe, de forma eficaz, a oxidação de um substrato oxidável, mesmo presente em baixas concentrações, quando comparada a esse substrato. Nesse contexto, o uso ou a ingestão de antioxidantes – de forma sintética ou em alimentos que compõem a dieta humana – pode ser considerado uma importante estratégia contra o estresse oxidativo provocado pela alta produção de radicais livres (WEIJL; CLETON; OSANTO, 1997), além de amenizar efeitos de metabólitos oriundos de resposta inflamatória tecidual.

2.7 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA *ANNONA MURICATA* L.

Na medicina popular, são utilizadas as folhas de *A. muricata* sob a forma de infusão, para o tratamento de diabetes, gripe, problemas do fígado e como um sedativo e antiespasmódico. A semente esmagada é utilizada como antiparasitário e vermífugo, além de inseticida. O óleo das folhas e da fruta verde é usado para nevralgia, reumatismo e artrites e o suco da fruta para febres e diarreia. A raiz é usada para o fortalecimento muscular do sistema cardíaco, tosse, gripe, asma, hipertensão e em infecções parasitárias (ALMEIDA, 1993; SANTIAGO, 2011).

Algumas propriedades da planta já foram descritas na literatura científica como analgésica e anti-inflamatória (ISHOLA et al., 2014); gastroprotetora (MOGHADAMTOUSI et al., 2014); antidiabética e antioxidante (FLORENCE et al., 2014); hipoglicemiante (ADEYEMI et al., 2009; ADEWOLE; OJEWOLE, 2009); hipotensiva (CARBAJAL et al., 1991); antimalárica (GBEASSOR et al., 1990; ANTOUN et al., 1993) antibacteriana (HEINRICH et al., 1992); antiparasitária (BORIES et.al., 1991); e pela presença de alcaloides, com efeitos antidepressivos (HASRAT et al., 1997) e ação antitumoral (RIESER et al., 1991; WU et al., 1995; SILVA; NEPOMUCENO, 2011).

Em estudos experimentais, o extrato das folhas da *A. muricata* apresentou ação hipoglicemiante e hepatoprotetora. Adeyemi e colaboradores (2009) avaliaram os efeitos da administração intraperitoneal de 100mg/kg de extratos de *A. muricata* em ratos diabéticos, durante 15 dias consecutivos. Os resultados indicaram redução significativa na concentração de glicose no sangue e melhora de peso corporal nos animais diabéticos tratados. Adewole e Ojewole (2009) também avaliaram a administração do extrato da *A. muricata* e, além de observarem redução de glicemia, relataram aumento da insulina sérica, o que pode ser atribuído ao aumento dos níveis de glutathione GSH hepática, interferindo assim com a progressão da peroxidação lipídica. Os autores sugerem que a indução de diabetes com estreptozotocina (STZ) está associada com o estresse oxidativo nos tecidos hepáticos e que o extrato aquoso de folhas de *A. muricata* tem atividade antioxidante capaz de inibir e/ou impedir dano hepático oxidativo produzido pela STZ.

Florence e colaboradores (2014) também avaliaram o efeito do extrato aquoso das folhas da *A. muricata* por administração oral (100 mg/kg ou 200 mg/Kg) em ratos diabéticos induzidos por STZ. Para avaliação do tratamento, após 2 semanas da indução, os animais receberam o extrato durante 28 dias. Para avaliação do efeito protetor, 3 dias antes da indução do diabetes, os animais receberam o extrato e foram observados durante 2 semanas sem tratamento. No estudo, não foi observado efeito protetor do extrato após 72h antes da indução. Após 14 dias de tratamento, o extrato (100mg/Kg) reduziu os níveis de glicemia até limiares próximos aos animais controles. O extrato da *A. muricata*, durante 28 dias de tratamento, reduziu glicemia, creatinina sérica, MDA, AST, ALT, níveis de nitritos e de LDL-colesterol. Os autores discutem que a atividade antidiabética do extrato pode estar relacionada ao seu efeito hipolipidêmico e ação antioxidante.

Um programa de triagem farmacológica do Instituto do Câncer, realizado em 1976, constatou a presença de ativos citotóxicos nas folhas e talos da graviola, que poderiam agir contra as células do câncer (SANTIAGO, 2011). Desde então, foram determinadas a presença de acetogeninas em várias partes da planta, dentre elas, nas sementes (RIESER et al., 1991; WU et al., 1995).

As acetogeninas são formadas pelo metabolismo secundário da planta, derivado dos ácidos graxos de cadeia longa (C35-C39) e contém duas cadeias longas de hidrocarbonetos, uma das quais conecta um grupo terminal γ -lactona-2-4disubstituído. São encontradas, especificamente, na família *Annonaceae* e apresentam atividade antitumoral e indutora de apoptose (CHIARATTI, 2008; MOGHADAMTOUSI et al. 2015), citotóxica, imunossupressora e antimicrobiana (VILA-NOVA et al., 2011). Os mecanismos de ação propostos para as acetogeninas envolvem a inibição de transporte de elétrons: 1) inibição do complexo I NADH, resultando na diminuição de níveis de ATP e inibindo desenvolvimento de células cancerígenas; 2) inibição da enzima NADH oxidase das membranas plasmáticas das células cancerígenas, resultando na diminuição da busca de ATP celular (CHIARATTI, 2008).

A literatura descreve os principais ácidos graxos presentes na semente da graviola, sendo estes o ácido oleico (ômega-9) (40,94%), linoleico (ômega 6) (33,02%) e palmítico (18,98%) (CASTRO et al., 1984). Alguns alcaloides, como a anonina, muricina e muricinina também foram encontrados em sementes de graviola (ROCHA; REIS LUZ; RODRIGUES, 1981), sendo utilizados para elaboração de bioinseticidas (FRANZÃO; MELO, 2007)

Não foram encontrados dados, até o momento, sobre utilização do óleo da semente da graviola em protocolos *in vitro* e experimentais, bem como sobre a atividade imunomoduladora. Acredita-se que as propriedades biológicas, como anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, das espécies vegetais, sejam em decorrência da presença, principalmente, de diferentes ácidos graxos e outros compostos bioativos presentes nas espécies, sendo a identificação e ação dessas substâncias, objetos de investigação.

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

Apresentam-se, a seguir, os objetivos estabelecidos para dar cumprimento a esta pesquisa.

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar as propriedades físico-químicas das sementes e do óleo das sementes da *Annona muricata* L. e avaliar ação imunomoduladora do óleo em modelos de diabetes melito tipo 1 *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição centesimal das sementes da *A. muricata*;
- Avaliar potencial antioxidante *in vitro* das sementes e óleo das sementes;
- Quantificar compostos fenólicos nas sementes da *A. muricata*;
- Determinar o perfil de ácidos graxos presentes no óleo das sementes da *A. muricata*;
- Identificar presença de acetogeninas no óleo da semente da *A. muricata*;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do óleo da semente da *A. muricata*;
- Avaliar potencial toxicológico *in vivo* do óleo da semente da *A. muricata*;
- Avaliar atividade imunomoduladora *in vivo* do óleo das sementes da *A. muricata* em modelo experimental de diabetes melito induzido por estreptozotocina;
- Avaliar atividade imunomoduladora *in vitro* do óleo das sementes da *A. muricata* em cultura celular de sangue total de pacientes com diabetes melito tipo 1 comparado com indivíduos saudáveis.

4. Método

4 MÉTODO

Esta seção compreende os procedimentos metodológicos adotados para alcançar os objetivos estabelecidos.

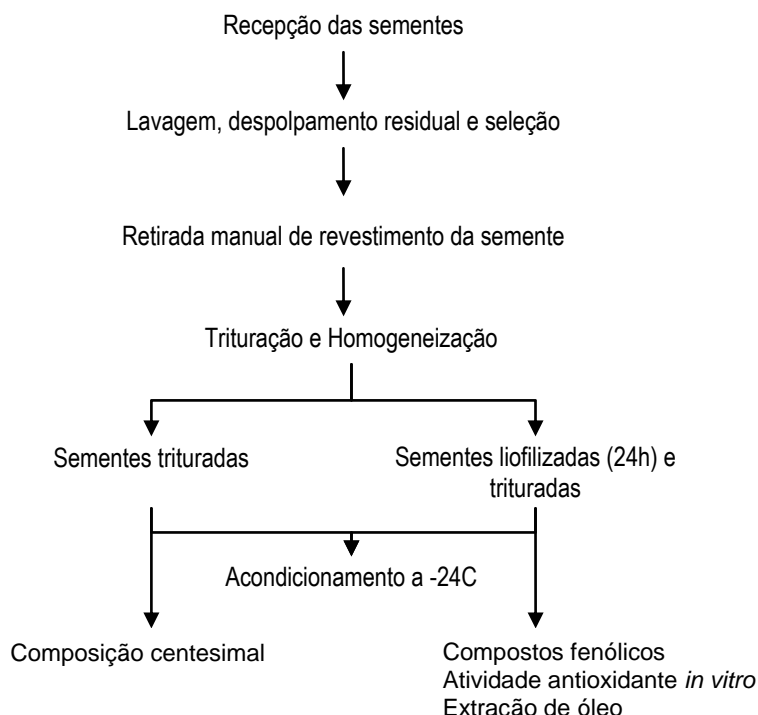
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SEMENTES E ÓLEO DAS SEMENTES DA *A. MURICATA*

Incluem-se, nesta seção, os procedimentos de obtenção e preparo das amostras, metodologia de extração do óleo, determinação da composição centesimal e compostos fenólicos das sementes, atividade antioxidante *in vitro* das sementes e óleo extraído, perfil de ácidos graxos e identificação de acetogeninas do óleo.

4.1.1 Preparo das amostras das sementes

As sementes foram cedidas gentilmente por uma indústria de polpa de frutas, localizada em Ilhéus, Bahia, Brasil, identificadas e estão, juntamente com outras partes da planta, registradas no Herbário da Universidade do Estado da Bahia (HUNEB - Coleção Paulo Afonso nº 28720). As sementes foram processadas, conforme apresenta a Figura 4. As amostras foram trituradas e armazenadas a -24°C. Uma parte destas foi liofilizada por 24h (Liofilizador Liobrás, Liotop, modelo L101). A lavagem, seleção e retirada da polpa residual foram feitas manualmente.

Figura 4 - Fluxograma para obtenção das amostras de sementes trituradas para processamento das análises



Fonte: Elaboração da autora.

O preparo das amostras, as análises de composição centesimal, compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro* e extração do óleo das sementes foram realizados no Laboratório de Análises Químicas da Universidade do Estado da Bahia.

4.1.2 Composição centesimal da semente

As determinações de umidade, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos, fibras totais, taninos e oxalatos, foram realizadas em triplicata nas sementes, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

A umidade foi determinada a partir da perda em massa sofrida pela amostra sob método de aquecimento direto a 105°C, a qual se constituiu em resíduo seco, inicialmente por 3 horas e seguido de 1 em 1 hora, até peso constante.

As cinzas foram obtidas por incineração das amostras em forno mufla a 550°C/6h, até a eliminação completa do carvão e transformação em resíduo mineral fixo.

A determinação dos lipídios foi realizada a partir da extração da amostra com solventes orgânicos em aparelho *Soxhlet* por 6 horas, com balão previamente pesado, seguida da remoção, por evaporação, do solvente empregado, calculando-se o peso adicional do balão.

As proteínas foram determinadas, seguindo três etapas: **digestão**, que consiste em aquecer a substância nitrogenada com ácido sulfúrico concentrado em presença de mistura catalítica, em temperatura de 330°C; **destilação**, em que a amônia é separada, por arraste a vapor, e recolhida em uma solução receptora; e **titulação**, na qual se determina quantitativamente a amônia contida na solução receptora, com solução padrão de ácido clorídrico 0,1N.

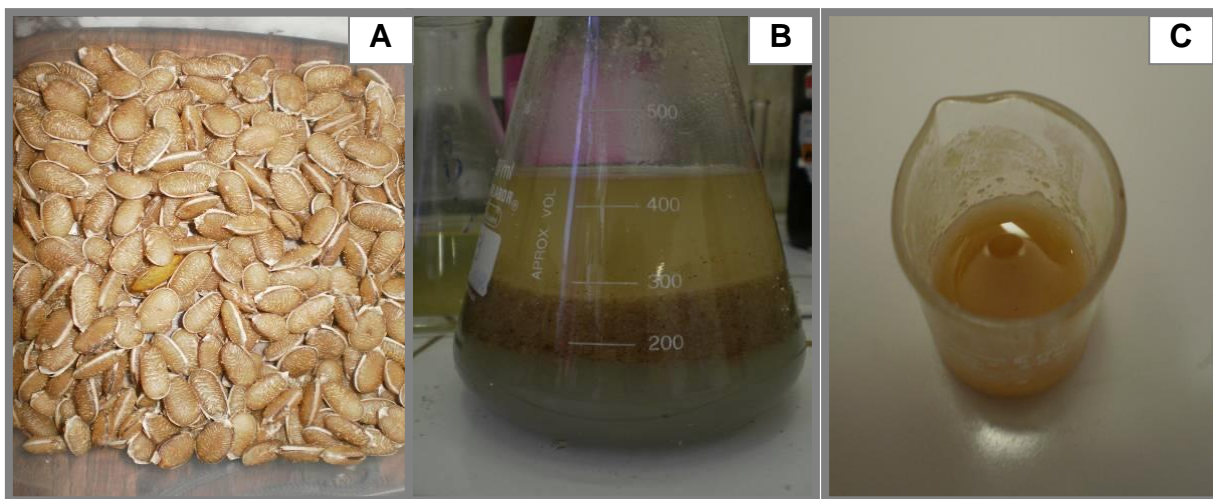
A determinação de fibra bruta foi realizada a partir das amostras previamente desengorduradas e secas, submetidas à digestão ácida, seguida de filtração e peso do filtrado, o qual foi calcinado em mufla a 550°C/6h e deduzido às cinzas, para diferença de peso.

A quantificação dos carboidratos foi realizada por diferença obtida pelo somatório das determinações percentuais de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e fibras.

4.1.3 Extração do óleo

A extração do óleo foi realizada segundo metodologia de Blig-Dyer (1959), com solventes metanol e clorofórmio, método de extração utilizado para amostras vegetais e de origem animal. A fase decantada, no processo de extração (Figura 5B), foi separada por funil de separação e concentrada em equipamento rota-evaporador a 30rpm, sob vácuo, a 45-55°C/30 minutos. Uma secagem final foi realizada por meio do contato direto com gás nitrogênio, para viabilizar a volatilização do solvente residual. O óleo bruto da semente da graviola (OsgB) apresentou uma coloração âmbar e alguns precipitados de textura cerosa (Figura 5C). A Figura 6 apresenta as fases do OsgB, após centrifugação (4.000rpm/5minutos/4°C), as quais foram descritas como fração líquida (FLOsg), correspondente à fase superior; e fração do precipitado (PtOsg), correspondente à fase decantada.

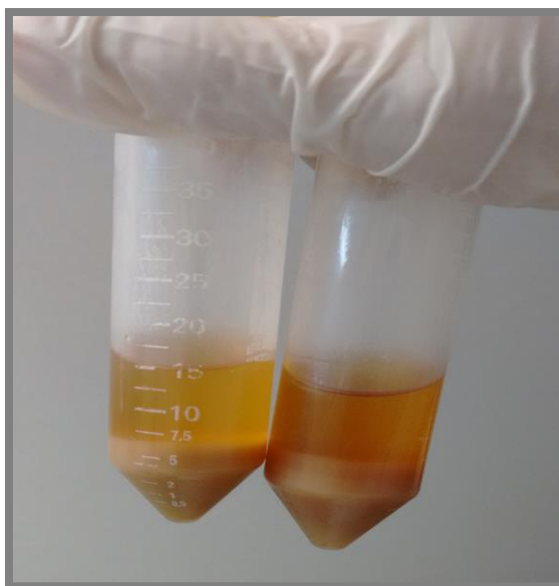
Figura 5 - Processos para obtenção do óleo da semente da *A. muricata*.



Fonte: Fotos sacadas pela autora.

Legenda: (A) Sementes da graviola retiradas da estrutura externa. (B) Fases obtidas durante extração do óleo a frio. (C) Óleo bruto (OsgB) obtido após rota-evaporação do solvente.

Figura 6 - Óleo extraído da semente da graviola após centrifugação.



Fonte; Fotos sacadas pela autora.

Legenda: Fase decantada: precipitado do óleo (PtOsg). Fase flutuante: fração líquida do óleo (FLOsg).

4.1.4 Quantificação de compostos fenólicos

Este processo é realizado conforme segue:

Preparo do extrato da semente

Os extratos foram obtidos por meio da adição do solvente (água ou metanol) na amostra das sementes liofilizadas, na concentração de 500 mg sólidos/L e, após homogeneização em equipamento vórtex por 5 minutos, a solução foi centrifugada (2.500 rpm/10 minutos) e filtrada em filtro de papel. A solução obtida foi utilizada para quantificar fenólicos totais.

Método para quantificação de fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado segundo métodos analíticos para determinação de taninos do Instituto Adolfo Lutz (2008). O método envolve a redução do reagente Folin-Dennis, em meio alcalino, pelo tanino presente na amostra, com formação de um complexo azul, cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm, sendo o resultado expresso em ácido tânico (ATE) e gálico equivalentes (AGE). A curva analítica variou de 0 a 8 mg/L e apresentou $R^2 = 0,9992$ para ATE; e $R^2 = 0,9998$ para AGE.

4.1.5 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* das sementes e FLOsg

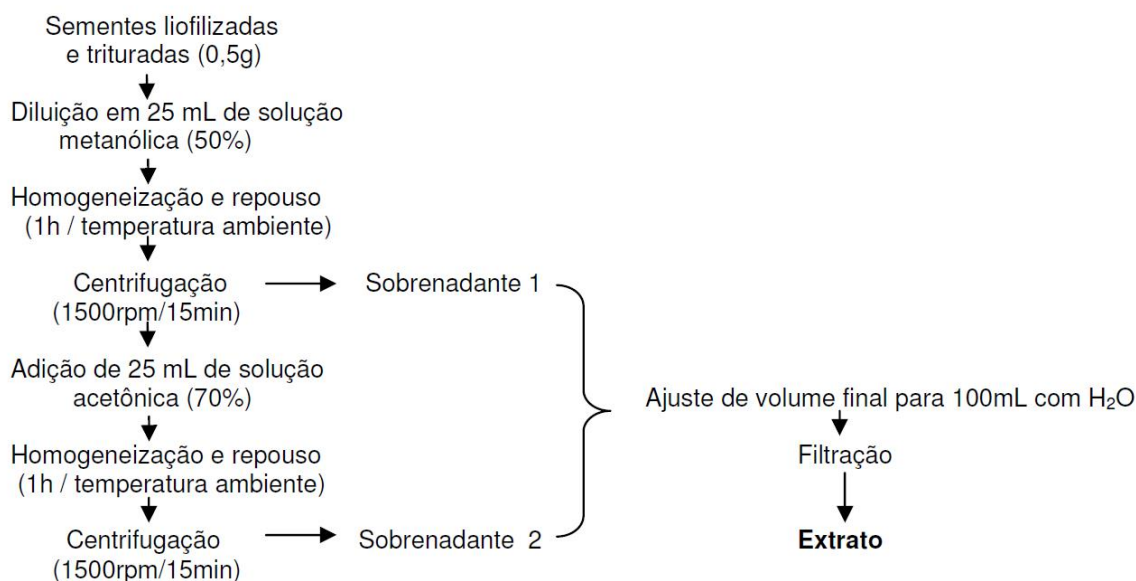
Como os radicais livres apresentam diferentes tipos e diferentes formas de atuação e alvo de oxidação nos organismos vivos, a avaliação conjunta de diferentes métodos que apresentem sistemas geradores de radicais livres visa a uma melhor definição da capacidade antioxidante de uma amostra (ALVES et al., 2010). Sendo assim, esta capacidade nas sementes e na FLOsg foi avaliada por três métodos *in vitro*. O ácido gálico foi utilizado como padrão nos três métodos antioxidantes avaliados.

Preparo dos extratos das sementes e FLOsg

Os extratos das sementes utilizados para os métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* foram obtidos conforme a figura 7 (adaptado de RUFINO et al., 2006; RUFINO et al., 2007).

Para obtenção da diluição da FLOsg, a solução metanólica foi adicionada ao óleo (0,5g) e mantida em repouso (1h/ temperatura ambiente), em seguida foi adicionada a solução acetônica. Após repouso, o volume final também foi ajustado até 100mL.

Figura 7 - Fluxograma de preparo da diluição das sementes da graviola para avaliação antioxidante *in vitro*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Método DPPH

Este método avalia a capacidade de uma amostra em sequestrar radicais livres, utilizando o radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH'), ou seja, está fundamentado na capacidade das substâncias antioxidantes presentes de reagirem convertendo esse radical estável em 2,2-difenil-1-picril hidrazina (ROESLER et al., 2007).

A solução de DPPH (0,006 mM) foi preparada e mantida no escuro a 4 °C, até o momento das determinações. Esta solução foi utilizada para determinar a curva de DPPH, com concentrações de 0 a 50 µM a 515 nm, sendo Eq.1 a equação da reta ($R^2= 0,999$). Três concentrações diferentes das diluições foram preparadas (1.000, 1.500 e 2.500ppm) em triplicata e alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos de ensaio, onde foram adicionados de 3,9mL de solução DPPH. Uma alíquota de 0,1mL da solução controle (solução de metanol 50% + solução acetônica 70% +

H₂O) também foi utilizada na leitura. Após 30 min, foi realizada a leitura a 515nm. O valor do y na Eq.1 foi substituído pelo valor correspondente à metade da absorvância inicial do controle (abs controle/2) para encontrar o consumo em µM DPPH (valor de x) e, em seguida, foi transformado para gDPPH*.

*Conversão de µM DPPH para g DPPH:

$$\text{g DPPH} = (\mu\text{M DPPH} / 1.000.000) * 394,3 \text{ (peso molecular do DPPH)}$$

Os valores da absorvância e diluições dos extratos foram utilizados para calcular a equação da reta (Eq. 2). A atividade antioxidante total das amostras foi determinada, utilizando a Eq.2, onde o y foi substituído ao correspondente a 50% da concentração do DPPH (abs controle/2), o valor de x foi o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (IC₅₀ mg/L). O valor de x foi dividido por 1.000 para ter o valor em g e, em seguida, dividido pelo valor encontrado em g DPPH (Eq. 1) para obter o resultado final (Eq. 3) que é expresso em g amostra/g DPPH.**

** IC₅₀ expresso em g amostra / g DPPH:

$$\text{g amostra / g DPPH} = (\text{IC}_{50} \text{ (mg/L)} / 1.000 * 1) / \text{g DPPH}$$

Método ABTS

O propósito do método é monitorar o decaimento do cátion-radical ABTS, produzido pela oxidação do ABTS (*2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazilone-6-sulfonate)*), gerado pela adição de uma amostra com antioxidantes. Uma curva analítica foi construída utilizando como padrão o trolox, um equivalente em vitamina E (0 a 2000ppm; R²= 0,9996), e calculada a absorvância respectiva para a concentração de 1000µM trolox equivalente (abs 1). Em seguida, uma curva analítica com três diluições da amostra foi construída e calculada a quantidade da amostra equivalente a abs 1, sendo expressa em µM trolox/g da amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro VIS/UV a 734nm (RUFINO et al., 2007).

Método FRAP

Este modelo FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) está relacionado com a capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isto ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), ocorre a formação de um complexo corado com o Fe^{2+} . O ensaio é expresso em ácido ascórbico equivalente. Uma curva analítica foi construída, utilizando como padrão o sulfato ferroso (0 a 1000ppm; $R^2= 0,9998$) e calculada a absorbância respectiva para a concentração de 1000 μM sulfato ferroso (abs 1). Em seguida, uma curva analítica com três diluições da amostra foi construída e calculada a quantidade da amostra equivalente a abs 1, sendo expressa em μM sulfato ferroso/g da amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro VIS/UV a 595nm (RUFINO et al., 2006).

A interpretação dos resultados dos ensaios obtidos é de que, em relação ao método do DPPH, o peso mais baixo da amostra, capaz de reduzir o DPPH a 50% (IC_{50}), significa que possui uma melhor atividade antioxidante. Nos métodos ABTS e FRAP, uma quantidade mais elevada em equivalente Trolox ou sulfato ferroso por grama de amostra, respectivamente, significa apresentar uma melhor atividade antioxidante.

4.1.6 Determinação do perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado pelo método de cromatografia gasosa, com coluna capilar aplicada aos ésteres metílicos da FLOsg, segundo a metodologia de Joseph e Ackman (1992). A quantidade de ácidos graxos totais (soma dos ácidos graxos livres e delimitados) na FLOsg foi obtido por transesterificação para os ésteres metílicos correspondentes: ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), por meio de saponificação com NaOH em metanol, seguido por metilação com solução catalisadora de trifluoreto de boro (BF_3) (em 12% de metanol). Os FAME foram extraídos com isoctano e armazenados em atmosfera inerte (N_2) a -18°C .

A separação FAME foi realizada no cromatógrafo de gás (Varian® 3800), equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica

fundida Elite-Wax (30 m × 0,32 mm × 0,25 mm). Os parâmetros de análise foram: temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector de 280°C. O seguinte programa térmico foi utilizado: 150°C durante 16 min, em seguida, aumentando a 2°C/min até 180°C, mantido durante 25 min, seguido um aumento de 5°C/min até 210°C, mantido por mais 25 min. O gás hélio foi utilizado como gás portador a 1,3 mL/min. O nitrogênio foi utilizado como gás *make up* (30 mL/min); fluxo de gás de hidrogênio e ar sintético foram fornecidos a 30 e a 300 ml/min, respectivamente.

As injeções foram realizadas em duplicata, em duas das amostras da FLOsg em volume de 1mL. Os FAME foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção, com os picos dos padrões autênticos (189-19, Sigma-Aldrich®, EUA). A quantificação de ácidos graxos, expresso em miligramas por grama de gordura, foi realizada através da adição de padrão interno (C23:0 Sigma®, EUA) e o cálculo dos lípidios extraídos de acordo Eq.1.

$$\text{Concentração (mg/g)} = \frac{(A_x \times W_{is} \times CF_x)}{(A_{is} \times W_s \times CF_s)} \times 1000 \quad (\text{Eq. 1})$$

A_x Área do pico do éster metílico do ácido graxo da amostra da cromatografia.

W_{is} Peso (em mg) do padrão interno adicionado à amostra.

CF_s Fator de conversão do éster metílico do ácido graxo para o ácido graxo.

A_{is} Área do pico do éster metílico do ácido graxo do padrão interno da na cromatografia.

W_s Peso da amostra (em miligramas).

CF_x Resposta do fator de correção de cada detector de ionização do éster metílico de ácido graxo relativo ao C23:0

O valor porcentual de cada ácido graxo presente no óleo foi obtido pela soma total dos ácidos graxos identificados (mgAG/g de gordura) e porcentual correspondente.

Esta cromatografia gasosa foi realizada no Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada (LAPESCA), da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal da Bahia.

4.1.7 Análise da presença de acetogeninas no óleo das sementes da graviola

Esta análise é feita mediante dois procedimentos, a seguir descritos.

Preparo das amostras

Para esta análise, foram utilizadas as amostras da FLOsg e PtOsg. O PtOsg (50 mg) foi dissolvido em metanol e acetonitrila (1:1). Um cartucho de sílica Sep-Pak (Waters) foi condicionado sequencialmente com 5mL de hexano e 5mL de diclorometano, sendo observado para que este não secasse. O resíduo precipitado foi passado através do cartucho e eluído com 10 mL de diclorometano, acetato de etila e metanol. Os eluatos foram secos sob pressão reduzida, em rota-evaporador a 40°C para se obter 14,0 mg de diclorometano, 13,5 mg de acetato de etilo e 8,0 mg de frações de metanol. Após a evaporação até a secagem, os resíduos foram dissolvidos em acetonitrila e metanol, filtrados através de um filtro de nylon de seringa de 0,45 microns (Whatman) e injetados no sistema de HPLC. As soluções obtidas e a do padrão foram armazenadas a 4°C.

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. O metanol de grau HPLC e a acetonitrila utilizados foram da Merck e Tedia, respectivamente. A água deionizada foi purificada usando um sistema Milli-Q da Millipore (Milford, MA, EUA).

Perfis cromatográficos

A cromatografia em camada fina para identificação de acetogeninas foi realizada na FLOsg e PtOsg e suas frações foram obtidas por extração SPE (extração de fase sólida), segundo Grzybowski e colaboradores (2012). As cromatoplasmas foram analisadas com hexano: clorofórmio: nitroetano: acetato de etilo: acetona: metanol: acetonitrilo: água (12: 2: 4: 4: 1: 2: 1,6: 0,1, v/v) como fase móvel. O *spray* específico para acetogeninas foi o Reagente de Kedde (ácido 3,5-dinitrobenzóico alcalinizado). As placas de cromatografia de camada fina foram feitas usando gel de sílica 60 F254 (Macherey-Nagel).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um Shimadzu LC-20AT proeminência equipada com um (SPD-M20) detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) (Shimadzu Corp. Quioto, Japão). As amostras foram injetadas em um

injector Rheodyne 7125i (50µl). O aquecimento da coluna foi fixado em 30°C. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Phenomenex Luna C-18 (250mm x 4,6mm x 5mm, Phenomenex). Os compostos foram separados utilizando uma fase móvel consistindo em água (A) e acetonitrila: metanol (1:1, B). O gradiente de separação foi de 0-20 min 70-100% B, 20-40 min 100%, com parada em 45 min. (taxa de fluxo de 1,0 mL/min). Uma amostra de 50 µL foi injetada e a detecção dos compostos foi realizada por luz, em um comprimento de onda de 215nm. Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados em pastilhas de KBr, espectrofotômetro Varian 640 FT-IR, com um acessório operacional Pike ATR na taxa de 4000-400 cm⁻¹. A cromatografia líquida por espectrometria de massa de ionização por *eletrospray-tandem* (LC-ESI-MS) foi obtida em modo de *eletrospray* negativo, utilizando um instrumento Esquire 3000 Plus (Bruker).

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, da Universidade Federal Rural de Pernambuco e coordenadas pela Profa. Tânia Maria Sarmiento da Silva.

4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO OSGB E FLOSG

Os procedimentos de avaliação toxicológica *in vitro* (modelo murino e humano) e *in vivo* (modelo murino) estão descritos a seguir:

4.2.1 Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro*

Segue detalhamento do ensaio de citotoxicidade.

Viabilidade celular por MTT-tetrazólio

Este ensaio se baseia na avaliação da extensão do dano induzido por um composto/extrato no metabolismo celular, por meio da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular é quantificada pela redução do MTT-tetrazólio [(brometo de 4,5-dimetiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) 3-] (sal de cor amarela) em Formazano (sal/cristal de cor púrpura) pela atividade enzimática. Assim, a redução de MTT em Formazano,

é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MOSSMAN, 1983).

A emulsão do OsgB foi preparada com DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) a 0,5% em meio RPMI (Gibco), seguida por filtração (poro de 0,2µm) para obtenção de uma solução estéril. O precipitado presente no óleo bruto ficou retido no filtro. Sendo assim, antes desse processo de filtração, uma quantidade de 40% do peso do óleo, em cada concentração, foi adicionada, para ajustar a perda média percentual do peso do óleo durante esse procedimento.

Um total de 200µL de suspensão de esplenócitos de camundongos Balb/c machos ($2,5 \times 10^6$ células/poço), enriquecido com FBS a 5% em meio RPMI (Gibco), foi adicionado em microplacas de 96 poços na ausência e presença de diferentes concentrações do óleo (4000 a 7,9µg/mL, em diluição seriada). A adição de uma solução de DMSO a 50% foi usada como controle negativo.

Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 20µl de solução de MTT-tetrazólio (Sigma-Aldrich) (5 mg/mL). Quatro horas após a adição de MTT e incubação, as placas foram centrifugadas a 3000rpm/10minutos e cerca de 170µl dos sobrenadantes foram descartados, cuidadosamente. Em seguida, foram adicionados 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) em cada poço. Após 10 minutos de reação, as placas foram submetidas à leitura a 570nm (adaptado a partir de MOSMANN, 1983).

As absorvâncias das células controles foram consideradas como 100% de viabilidade celular e utilizadas como referência para os cálculos percentuais de viabilidade das células expostas ao óleo.

Viabilidade celular por Resazurina sódica

A resazurina é o composto principal do AlamarBlue®. Esse ensaio mede quantitativamente a proliferação de várias linhagens celulares: humanas e animais, além de bactérias e fungos. O ensaio incorpora um indicador de crescimento fluorométrico/colorimétrico (redução-oxidação). O crescimento celular contínuo mantém um ambiente reduzido (Resofurina: fluorescente, rosa/vermelho), enquanto que a inibição de crescimento celular mantém um ambiente oxidado (Resazurina: não fluorescente, azul) (RAMBERSAD, 2012).

Viabilidade por Resazurina sódica em esplenócitos murino

A padronização desse ensaio na cultura de esplenócitos foi realizada conforme os procedimentos descritos para distribuição da suspensão celular e da emulsão do óleo, em placas de cultura, no ensaio MTT-tetrazólio. Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 15µL de solução de Resazurina (Sigma-Aldrich) (0,312mg/mL). As placas foram reincubadas *overnight* e foram submetidas à leitura a 570nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) (Figura 8).

Para calcular a diferença porcentual de redução da Resazurina das células controles, em relação às células tratadas com a emulsão de óleo, foi utilizada a equação, de acordo com o fabricante:

$$\frac{(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} A_{\lambda 1} - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} A_{\lambda 2} \text{ das células tratadas}}{(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} A^{\circ} \lambda 1 - (\epsilon_{OX})_{\lambda 1} A^{\circ} \lambda 2 \text{ das células controles positivo}} \times 100$$

Onde:

$\lambda 1$ = absorvância na forma reduzida (570)

$\lambda 2$ = absorvância na forma oxidada (600)

ϵ = coeficiente de molaridade

$(\epsilon_{OX})_{\lambda 2} = 117,216$

$(\epsilon_{OX})_{\lambda 1} = 80,586$

$(\epsilon_{RED})_{\lambda 1} = 155,677$

$(\epsilon_{RED})_{\lambda 2} = 14,652$

$A_{\lambda 1}$ = absorvância das células tratadas

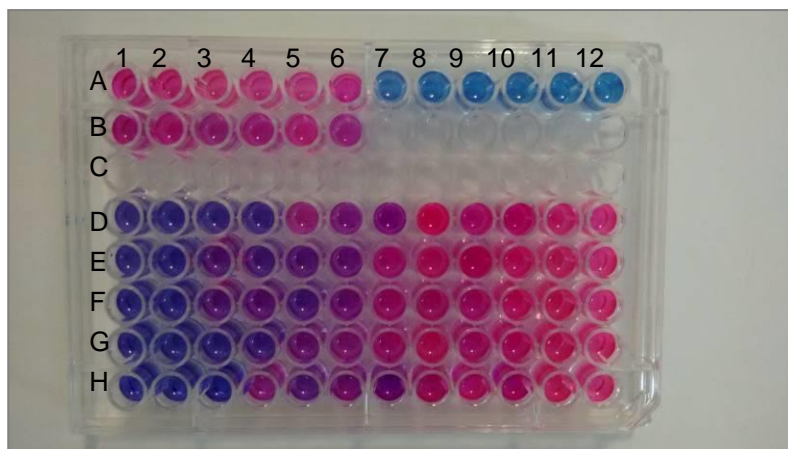
$A_{\lambda 2}$ = absorvância das células tratadas

$A^{\circ} \lambda 1$ = absorvância das células controles positivo

$A^{\circ} \lambda 2$ = absorvância das células controles positivo

Os percentuais de redução da Resazurina das células controles foram considerados como 100% de viabilidade celular e utilizados como referência para os cálculos percentuais de viabilidade das células expostas ao óleo.

Figura 8 - Placa de cultura de esplenócitos exposta ou não a FLOsg com resazurina sódica após incubação *overnight*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Redução da resazurina (azul) em resofurina (rosa). Azul: menor atividade celular. Rosa: metabolismo celular ativo. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. A1 a A6- grupo controle: esplenócitos não expostos a FLOsg. A7 a A12- grupo controle negativo: esplenócitos não expostos a FLOsg + DMSO a 50%. B1 a B6- grupo controle/solvente: esplenócitos não expostos a FLOsg + DMSO a 0,5%. D1 a D12- esplenócitos expostos a FLOsg em concentrações seriadas de 4.000 a 7,9 µg/mL. E1 a H12: replicatas pertinentes às concentrações seriadas.

Viabilidade por Resazurina sódica em células de sangue periférico humano

A cultura celular de sangue total foi realizada em placas de 96 poços, conforme cultura de sangue total descrita por Alcântara-Neves e colaboradores (2014). Após a coleta do sangue periférico, o sangue total foi cultivado a uma proporção de 1:4 (50µL de sangue + 150µL de meio) em meio RPMI (Gibco), suplementado com L-glutamina, antibióticos e soro bovino fetal, na ausência e presença da emulsão do óleo em diluição seriada (4.000 a 7,8µg/mL). DMSO a 50% foi utilizado como controle negativo. DMSO 0,5% foi utilizado como veículo. Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 15µL de solução de Resazurina sódica (Sigma-Aldrich) (0,312mg/mL). As placas foram reincubadas *overnight*, após a incubação foram centrifugadas a 2500rpm/10min/4°C) e 60µL dos sobrenadantes da cultura transferidos para outra placa.

Nessa cultura de sangue total, os sobrenadantes foram separados devido à impossibilidade de leitura, considerando a densidade de células vermelhas em cultura, o que impossibilitou a leitura espectrofotométrica, como realizada na cultura de esplenócitos. Considerando que a resazurina pode ser utilizada para avaliação

qualitativa conforme descrito previamente (RAMPERSAD, 2012), a avaliação da citotoxicidade neste sistema foi realizada pela diferença de coloração do indicador oxi-redução de forma qualitativa.

4.2.2 Avaliação da toxicidade *in vivo* de doses repetidas do OsgB e FLOsg

Segue o detalhamento da avaliação da toxidade indicada.

Protocolo experimental de toxicidade in vivo

Camundongos BALB/c, machos (7-8 semanas) foram alojados a 22°C e receberam água e ração *ad libitum* durante todo o protocolo experimental de 14 dias, para avaliar a toxicidade de doses repetidas do OsgB e FLOsg (adaptado de ANVISA, 2010). As doses administradas neste protocolo foram de 0,5mL/Kg peso do animal e 1,0 mL/Kg peso do animal.

DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) a 0,5% foi utilizado como veículo para emulsão do óleo em salina. Esta avaliação foi feita em dois protocolos.

No protocolo OsgB, os animais foram divididos em três grupos, sendo distribuídos 6 animais por grupo:

- 1) Grupo *CtrlOsgB* (controle): receberam diariamente 200µL de salina + DMSO a 0,5% por via oral;
- 2) Grupo *OsgB0,5*: receberam diariamente 200µL de salina com óleo bruto a 0,5 mL/kg de peso + 0,5% de DMSO por via oral;
- 3) Grupo *OsgB1,0*: receberam diariamente 200µL salina com óleo a 1,0 mL/kg de peso + DMSO a 0,5% por via oral.

O protocolo FLOsg foi realizado com a mesma distribuição de grupos de animais e as mesmas doses utilizadas do óleo, diferindo apenas na forma final da preparação da emulsão do óleo, sendo este último filtrado com filtro 0,2µm. O processo de filtração permitiu separar o precipitado presente no óleo bruto (PtOsg) da fração líquida (FLOsg). A quantidade do óleo foi ajustada, sendo adicionados mais 40% do volume em ambas as concentrações, devido ao peso do PtOsg retido no filtro. Os grupos foram definidos como:

- 1) Grupo *CtrlFLOsg*;

2) Grupo *FLOsg0,5*;

3) Grupo *FLOsg1,0*.

No dia 14 (D14), os animais foram eutanasiados (150mg/Kg de tiopental associado com 10mg/Kg de lidocaína i.p.) e as amostras coletadas para análise de toxicidade.

Análises físicas

Os animais foram pesados no D1 e D14 do protocolo. Em D14, antes da eutanásia, três observadores independentes treinados em experimentação animal avaliaram a aparência geral dos animais, de acordo com a escala de sinais de toxicidade: (0) aparência e pelagem normais; (1) pouca caquexia e pouca alteração de pelagem; (2) caquexia e alteração de pelagem (adaptado de LERCO et al., 2003). Fígado e baço foram colhidos e a variação do peso desses órgãos também foi avaliada. A razão do peso do fígado inteiro/peso corporal do animal foi calculada para identificar o peso hepático relativo (RITTER et al., 2012).

Análises histopatológicas

As amostras de fígado e rim foram embebidas em parafina, duas vezes após a fixação com formalina a 10%, utilizando um micrótomo; os blocos de parafina foram cortados em secções seriadas de 3 μ M. Na fase de coloração, as lâminas foram imersas em hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram processadas no Setor de Histotecnologia, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia.

As alterações histopatológicas foram avaliadas por dois patologistas de forma cega, coordenadas pela Dra. Karina Medeiros, do Departamento de Morfologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Análises bioquímicas e hematológica

As dosagens de glicemia, colesterol total, ureia e creatinina séricas foram realizadas em equipamento semiautomático Bioplus 2000, por kits comerciais (Doles), de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação de leucócitos foi realizada por contagem manual, com diluição em líquido de Turk (200µL de líquido de Turk + 20 µL de sangue com EDTA).

Estas análises foram realizadas no Hospital Veterinário da Unime (HOSVET).

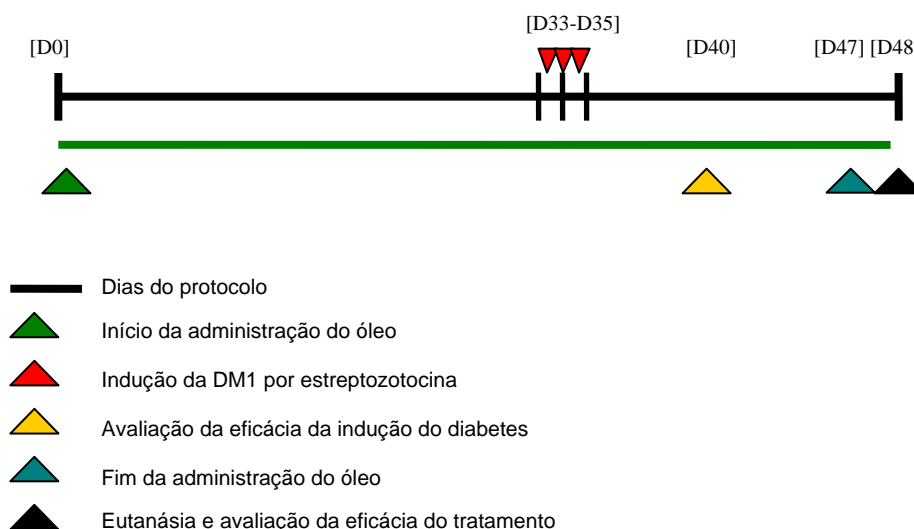
4.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES DA FLOSG EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELITO AUTOIMUNE

Compreende os aspectos que envolvem a avaliação citada.

4.3.1 Protocolo experimental de diabetes melito autoimune

A indução do DM foi realizada por protocolo padronizado por Cerqueira-Lima e colaboradores (2014), representado na Figura 9. Camundongos Balb/c (7-8 semanas), machos, receberam diariamente o FLOsg na dose de 1 mL/Kg peso, durante 48 dias, por via oral até o dia anterior a eutanásia. A indução do diabetes foi realizada no [D33-D35] por três injeções consecutivas de 100mg/Kg de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). A STZ foi solubilizada em tampão citrato 50mM e pH 4,5 e administrada em até 15 minutos após a diluição. Um volume total de 200µL de solução de STZ foi injetado, via intraperitoneal, nos animais em jejum de 8 horas. No [D40] foi avaliada a eficácia da indução do DM, por dosagem da glicemia, a partir de sangue obtido da veia caudal por dosador elétrico (Accu-Chek Active, Roche). A indução do diabetes foi confirmada pela dosagem da glicemia no grupo STZ, considerando como indução efetiva a glicemia acima de 200mg/dL no respectivo grupo (LERCO et al., 2003).

Figura 9 - Protocolo experimental do modelo de diabetes autoimune e tratamento com o FLOsg.



Fonte: Dados da pesquisa.

O FLOsg foi solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) a 0,5% e em solução salina para formar uma emulsão. A emulsão foi filtrada em filtro de seringa (0,2 μ m) e o peso do óleo retido no filtro foi ajustado, cerca de 10% para a fração líquida (FLOsg). A administração do óleo, em período anterior à indução do DM, implica em simular uma modificação na dieta habitual dos animais, que poderia influenciar em uma modulação anterior à resposta inflamatória. Essa administração foi continuada durante os dias da indução do DM e após, até o [D47] para avaliar a eficácia imunomoduladora no quadro patológico instalado.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais e distribuídos um total de 6 a 7 animais por grupo:

- 1) *Ctrl* (Controle negativo): receberam salina via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias;
- 2) *Stz* (Controle positivo): receberam salina via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias;
- 3) *Stz-FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias;

4) *FLOsg*: receberam a *FLOsg* na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias.

Análises físicas

Os animais foram pesados no [D0] e [D47] do protocolo. Em [D48], antes da eutanásia, três observadores independentes, treinados em experimentação animal, avaliaram a aparência geral dos animais, de acordo com a escala de sinais de alterações físicas: (0) aparência e pelagem normais; (1) pouca caquexia e pouca alteração de pelagem; (2) caquexia e alteração de pelagem (adaptado de LERCO et al, 2003). Fígado e baço foram colhidos e a variação do peso desses órgãos também foi avaliada. A razão do peso do fígado inteiro/peso corporal do animal foi calculada para identificar o peso hepático relativo (RITTER et al., 2012).

Dosagem de glicemia e insulina sérica

A glicose sanguínea foi determinada nos animais em jejum de 8 horas, a partir de sangue obtido da veia caudal por dosador elétrico (Accu-Chek Active, Roche) e avaliada no [D0] e [D47] do protocolo experimental. No [D40], a glicemia foi avaliada apenas no grupo *Stz* para confirmação da indução do diabetes, a qual apresentou uma média de 213 mg/dL.

A insulina foi dosada por um kit de ELISA específico para camundongos (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden) no sangue coletado dos animais após a eutanásia.

Parâmetros bioquímicos

Um parâmetro bioquímico hepático (Alanina transaminase - ALT sérica) e um renal (creatinina sérica) foram avaliados. As dosagens de ALT e creatinina foram realizadas em equipamento semiautomático Bioplus 2000, por kits comerciais (Doles), de acordo com as recomendações do fabricante. Esta análise foi realizada no Hospital Veterinário da Unime (HOSVET).

Análises histopatológicas

Pâncreas e fígado foram coletados para avaliações histológicas. Os procedimentos para os cortes e elaboração das lâminas estão descritos no item 4.2.2.1.2.

Os cortes do pâncreas e rim foram corados com hematoxilina-eosina (H/E). Os cortes do fígado foram corados com hematoxilina-eosina (HE), tricômio de Masson e ácido periódico de Shif (PAS). Essas colorações foram selecionadas conforme protocolo de Gulle e colaboradores (2014).

As lâminas foram processadas no Setor de Histotecnologia, da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia.

As análises das lâminas foram feitas com microscopia óptica (Nikon Labophot) a 400X e 100X. A área das ilhotas pancreáticas foi medida com o auxílio do *Software Image G*. Foram selecionadas, aleatoriamente, de forma cega, 15 áreas no campo de alta potência (HPF, 100x) de cada amostra. Essas avaliações foram coordenadas pela Dra. Karina Medeiros, do Departamento de Morfologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

Ensaio in vitro da produção de citocinas (IL-10, IL-17, IL-4)

Após a eutanásia, as células do baço dos animais diabéticos (grupo *Stz*) foram distribuídas em placas de cultura na ausência e presença da FLOsg, em concentrações de 125, 62,5 e 31µg/mL. A FLOsg foi previamente diluída em salina + DMSO (0,5%) como veículo. Após diluição, a solução foi filtrada em 0,2µm e o peso retido no filtro foi ajustado. As células do grupo controle (animais do grupo *Ctrl*) foram cultivadas na ausência da FLOsg.

Após incubação (37°C, 5%, CO₂, 24h), os sobrenadantes da cultura de células foram recolhidos e a quantificação de IL-10 (interleucina-10), IL-4 (interleucina-4), IL-17 (interleucina-17) foi realizada por kits comerciais ELISA (BD Pharmingen®, EUA), conforme recomendações do fabricante.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR *IN VITRO* DA FLOSG EM CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DM1

Compreende os aspectos que envolvem a avaliação citada.

4.4.1 Seleção de indivíduos e coleta de amostras de sangue periférico humano

Um total de 12 pacientes diabéticos, em acompanhamento pelo Dr. Crésio Alves, no Ambulatório de Endocrinologia e Pediatria do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), da Universidade Federal da Bahia, foram convocados voluntariamente para coleta de sangue. Os critérios de seleção foram baseados em indivíduos com diagnóstico de DM1, idade entre 7-25 anos, de ambos os sexos e com um parâmetro de diabetes autoimune positivo (autoanticorpos) (adaptado de FRANSNELLI et al., 2014).

Mais 6 indivíduos não diabéticos foram convocados, voluntariamente, para compor o grupo controle sem diabetes (SDM). Os critérios de inclusão foram baseados em indivíduos que, por pelo menos um período de 1 ano, apresentaram valores normais de glicemia em jejum e de outros parâmetros metabólicos, como valores de colesterol e triglicérides normais, e que não usavam medicamentos para controle glicêmico. Foram selecionados indivíduos controles de ambos os sexos e dentro da faixa etária do grupo diabético (adaptado de FRANSNELLI et al., 2014).

Dosagem de autoanticorpos pancreáticos (anti-GAD; anti-IA2; anti-insulina) foram realizadas em todos os pacientes selecionados, para confirmar a autoimunidade nos pacientes diabéticos e exclusão de DM idiopáticas como DM neonatal e secundária a uso de medicamentos e outras doenças pancreáticas, além de excluir pacientes controles sem diabetes com fatores de risco. Essas dosagens foram realizadas em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas LABCHECAP.

Em média, 10 mL de sangue periférico foram coletados de cada paciente e as amostras foram encaminhadas ao Laboratório IMUNOBIO (Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia – ICS/UFBA) para prosseguir as etapas de cultivos celulares *in vitro* e separação do soro. Este foi encaminhado para o Laboratório LABCHECAP, para a realização das dosagens dos autoanticorpos.

4.4.2 Cultura de sangue total e dosagens de citocinas

Após a coleta do sangue periférico, o cultivo de sangue total foi realizado a uma proporção de 1:4 (125µL de sangue + 375µL de meio) em meio RPMI (Gibco) enriquecido com L-glutamina, antibióticos e soro bovino fetal, em dois períodos de 24h e 72h, a 37°C e 5% CO₂ (adaptado de ALCÂNTARA-NEVES et al., 2014). Foram realizadas culturas não estimuladas e estimuladas com a FLOsg, nas concentrações de 125, 62,5 e 31µg/mL. A FLOsg foi previamente diluída em salina + DMSO (0,5%) como solvente. Após diluição, a solução foi filtrada em 0,2µm, sendo adicionado mais 10% da FLOsg nesta solução estoque, devido ao seu peso retido no filtro e utilizada na cultura celular, conforme concentrações discriminadas.

As dosagens de IL-10 e IFN-γ foram realizadas nos sobrenadantes das culturas pela técnica de ELISA sanduíche, seguindo as recomendações do fabricante (BD-Pharmingen).

As células não estimuladas dos pacientes controles SDM foram comparadas com estas mesmas células não estimuladas na presença de DMSO a 0,5%, para avaliar a influência do solvente, utilizado para diluição da FLOsg, na produção das citocinas.

A dosagem de IL-10 foi realizada apenas no período de 24h, uma vez que Alcântara-Neves e colaboradores (2014) padronizaram essa dosagem e identificaram pico da produção dessa citocina, neste período. As dosagens do IFN-γ foram avaliadas nos dois períodos de incubação (24 e 72h).

4.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os procedimentos com animais no protocolo toxicológico foram realizados de acordo com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais em Ensino e Pesquisa, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (CEUA/ICS 029/2012) (ANEXO A).

Todos os procedimentos, envolvendo coleta de sangue e cultivo de células humanas de sangue, foram realizados segundo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana, do ICS/UFBA (Parecer nº 1.092.591) (ANEXO B). Os voluntários, menores de idade e alfabetizados, assinaram um Termo de

Assentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A) e os responsáveis pelos menores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B).

O protocolo experimental de diabetes tipo 1 foi realizado duas vezes e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqGM 011/2014) (ANEXO C).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O tipo de distribuição dos dados (se gaussiana ou não) foi determinado pelo método de *Kolgoromov-Smirnov* com o programa GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.). A análise *One-way* (ANOVA) de variância e a correção de *Tukey*, como pós-teste (para dados com distribuição normal) e de *Kruskal Wallis* e de *Dunn*, como pós-teste (para dados sem distribuição normal), foram utilizados para determinar a significância estatística entre os grupos no GraphPad V5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Teste *t de Student* também foi utilizado para determinar significância entre dados pareados. Para avaliar correlação entre dados, o teste de *Pearson* foi utilizado. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5 RESULTADOS

Aqui são apresentados os resultados obtidos nas análises de caracterização físico-química das sementes da graviola e óleo extraído das sementes, dados da avaliação toxicológica *in vivo* e *in vitro* e resultados obtidos dos modelos de estudo de diabetes melito tipo 1 *in vivo* e *in vitro*.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS SEMENTES E ÓLEO DAS SEMENTES DA GRAVIOLA

A caracterização aqui indicada refere-se à composição centesimal, teor de compostos fenólicos, avaliação antioxidante *in vitro*, perfil de ácidos graxos e identificação de acetogeninas no óleo da semente da graviola.

5.1.1 Composição centesimal da semente

A Tabela 1 apresenta os dados da composição centesimal das sementes *in natura* da graviola. Os principais nutrientes identificados foram lipídios (18,3g%) e fibras brutas (24,7g%). As proteínas corresponderam a aproximadamente 10g% das sementes, os carboidratos em 11g% e cinzas ou resíduo mineral fixo correspondeu a 1,3g%.

Tabela 1 - Composição centesimal (g%) das sementes da graviola *in natura*.

	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Fibras
Sementes <i>in natura</i>	34,70 ±0,02	1,30 ±0,01	18,30 ±0,28	9,85 ±0,31	11,15	24,70 ±0,52

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Valor médio da triplicata (g%) ± desvio padrão

5.1.2 Quantificação de compostos fenólicos

O total de compostos fenólicos nos extratos aquosos das sementes liofilizadas da graviola foi de 3,2±0,02 mg TAE/g do extrato e 3,1±0,02 mg GAE/g do extrato (equivalentes em ácido tânico e ácido gálico, respectivamente), apresentando, desta forma, uma variação de 310-320mg% de compostos fenólicos.

Os extratos metanólicos apresentaram turbidez, o que impossibilitou a leitura no espectrofotômetro.

5.1.3 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* do das sementes e FLOsg

A Tabela 2 apresenta os valores médios da capacidade antioxidante *in vitro* das sementes da graviola e FLOsg. Comparando com os valores do OSG, as sementes apresentaram maior capacidade antioxidante.

Tabela 2 - Capacidade antioxidante *in vitro* da semente da graviola e FLOsg.

	DPPH IC ₅₀ (µg/mL DPPH)	ABTS (µmol trolox/g)	FRAP (µmol Fe ₂ SO ₄ /g)
Sementes liofilizadas	74.206,6	124,0	52,3
FLOsg	370.133,0	40,2	50,7
Ácido gálico (padrão)	1,30	18.917,0	41.946,7

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: DPPH- radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil. IC- capacidade inibitória. ABTS- radical 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazilina-6-sulfonate). FRAP- *Ferric Reducing Antioxidant Power*. Trolox- padrão equivalente à vitamina E. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. Análises feitas em triplicata.

5.1.4 Determinação do perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos da FLOsg está apresentado na Tabela 3. A FLOsg apresentou um total de 75% de ácidos graxos insaturados. O perfil das duas amostras de óleo analisadas, cada uma em duplicata, foi semelhante. Houve maior variação para os ácidos graxos palmítico e linoleico, com desvio padrão de 2,16 e 2,30, respectivamente.

Considerando o porcentual de ácidos graxos insaturados, 40% deles correspondem a ácidos monoinsaturados, representado por 39,2% em ácido oleico (ω -9). O segundo maior porcentual identificado (33%) corresponde ao ácido linoleico (ω -6), que é um ácido graxo essencial. A FLOsg contém baixo teor de ácido α -linolênico (ω -3). Em relação ao total de ácidos graxos saturados identificados (24,5%), o ácido palmítico (19,3%) é o mais representativo.

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos da FLOsg por cromatografia gasosa (CG).

Ácidos graxos	Nomes	Extração 1		Extração 2		Extração 1 e 2	
		mgAG/g gordura	mgAG%	mgAG/g gordura	mgAG%	Média (mgAG%)	Desvio Padrão
C16:0	<i>Palmítico</i>	128,72	17,78	150,80	20,83	19,31	2,16
C16:1 ω 7	<i>Palmitoléico</i>	11,29	1,56	11,72	1,62	1,59	0,04
C18:0	<i>Esteárico</i>	29,76	4,11	36,20	5,00	4,56	0,63
C18:1 ω 9 ϵ	<i>Oléico</i>	283,87	39,22	283,65	39,19	39,21	0,02
C18:2 ω 6 ϵ	<i>Linoléico</i>	250,53	34,61	227,00	31,36	32,99	2,30
C18:3 ω 3	<i>α-Linolênico</i>	9,21	1,27	8,70	1,20	1,24	0,05
C20:0	<i>Araquidônico</i>	3,26	0,45	3,91	0,54	0,50	0,06
C20:1 ω 9	<i>Gadoléico</i>	nd	nd	0,95	0,13	0,07	0,09
C22:0	<i>Beênico</i>	1,09	0,15	n,d,	n,d,	0,08	0,11
C24:0	<i>Lignocérico</i>	1,19	0,17	0,91	0,13	0,15	0,03
Σ Saturados		164,02	22,49	191,83	26,50	24,50	2,84
Σ Insaturados		554,9	76,66	532,01	73,50	75,08	2,23
Σ Monoinsaturados		295,19	40,78	296,32	40,94	40,86	0,11
Σ Poliinsaturados		259,74	35,88	235,7	32,56	34,22	2,35

Fonte: Dados da pesquisa.

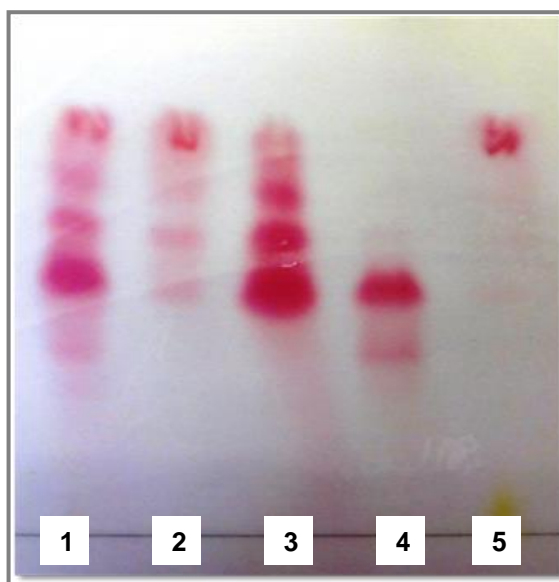
Legenda: AG: ácidos graxos, nd: não detectado

Valores médios das duplicatas em duas amostras da FLOsg extraídas (Extração 1 e Extração 2)

5.1.5 Análise de compostos no óleo bruto das sementes da graviola

A Figura 10 apresenta o perfil cromatográfico, em cromatoplaça, da FLOsg e do PtOsg e suas frações obtidas por extração SPE que revelou *spots* de coloração rósea-vinho, sugerindo reação de *Kedde* positiva e presença de compostos da família acetogenina. A coloração foi revelada em todas as amostras analisadas e indicou maior presença de acetogeninas no PtOsg (Figura 10-1) em relação a FLOsg (Figura 10-5). Na extração de fase sólida (Figura 10- 2, 3 e 4), o principal composto foi mais bem solubilizado na fração metanólica (Figura 10-4).

Figura 10 - Cromatoplaça da FLOsg, PtOsg e suas frações. *Spray* com o reagente de *Kedde*.



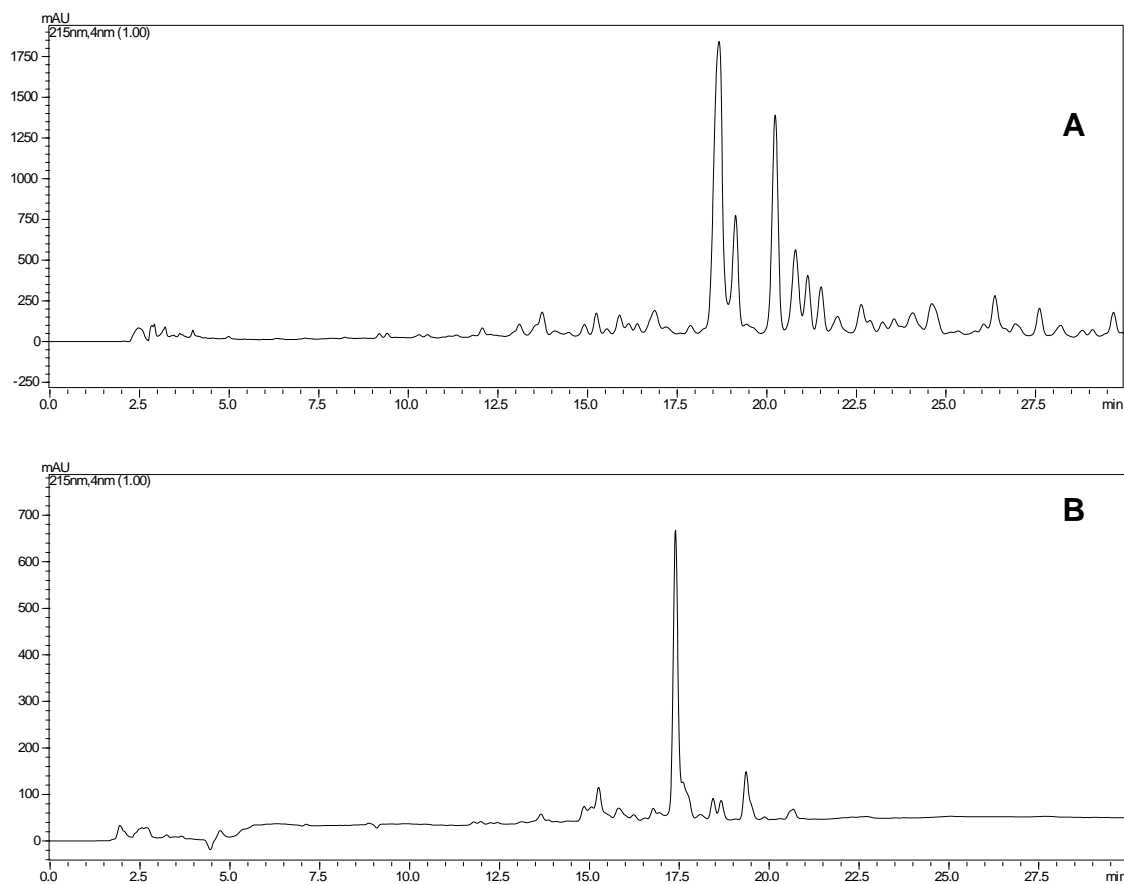
Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: 1) PtOsg- .precipitado do óleo da semente da graviola. 2) Fração diclorometano do PtOsg. 3) Fração de acetato de etila do PtOsg. 4) Fração de metanol do PtOsg. 5) FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola.

A Figura 11 apresenta a análise em HPLC-DAD. O tipo de acetogenina foi sugerida por análise de cromatografia líquida com espectrômetro de massa (LC-MS), na qual foram detectados vários picos com pesos moleculares (valores m/z) desses compostos. Em todas as amostras, os picos mais abundantes corresponderam ao peso molecular sugestivo da anonacina ($C_{35}H_{64}O_7$; m/z : 595 $[MH]^+$) (Figuras 11 e 12). O fracionamento do resíduo precipitado por SPE permitiu observar a mais

importante acetogenina, o que foi confirmado ser a anonacina (m/z 595, [MH]⁺), principalmente na fração metanólica (Figura 11-B).

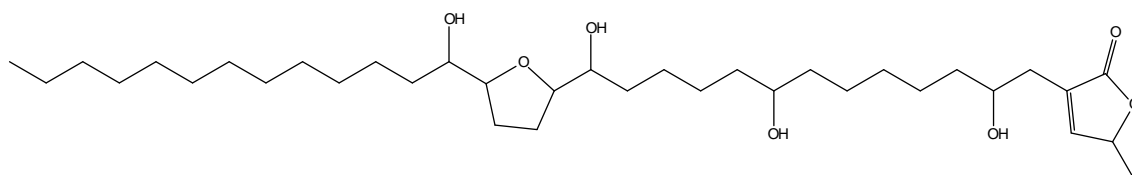
Figura 11 - Cromatogramas do HPLC-DAD (215nm) do PtOsg e sua fração metanólica.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (A) PtOsg- precipitado do óleo da semente da graviola. (B) Fração metanólica do PtOsg

Figura 12 - Estrutura química da anonacina (Moghadamtousi et al, 2015).



Fonte: Dados da pesquisa.

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA FLOSG E TOXICIDADE *IN VIVO* DO OSGB E A FLOSG

Esta seção compreende os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular *in vitro* e avaliação toxicológica em modelo animal *in vivo*.

5.2.1 Ensaio de citotoxicidade celular *in vitro*

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular *in vitro* em esplenócitos murino estão apresentados na Figura 13. Em ambos os ensaios, o veículo (DMSO 0,5%), usado para a diluição do óleo em RPMI, não apresentou citotoxicidade.

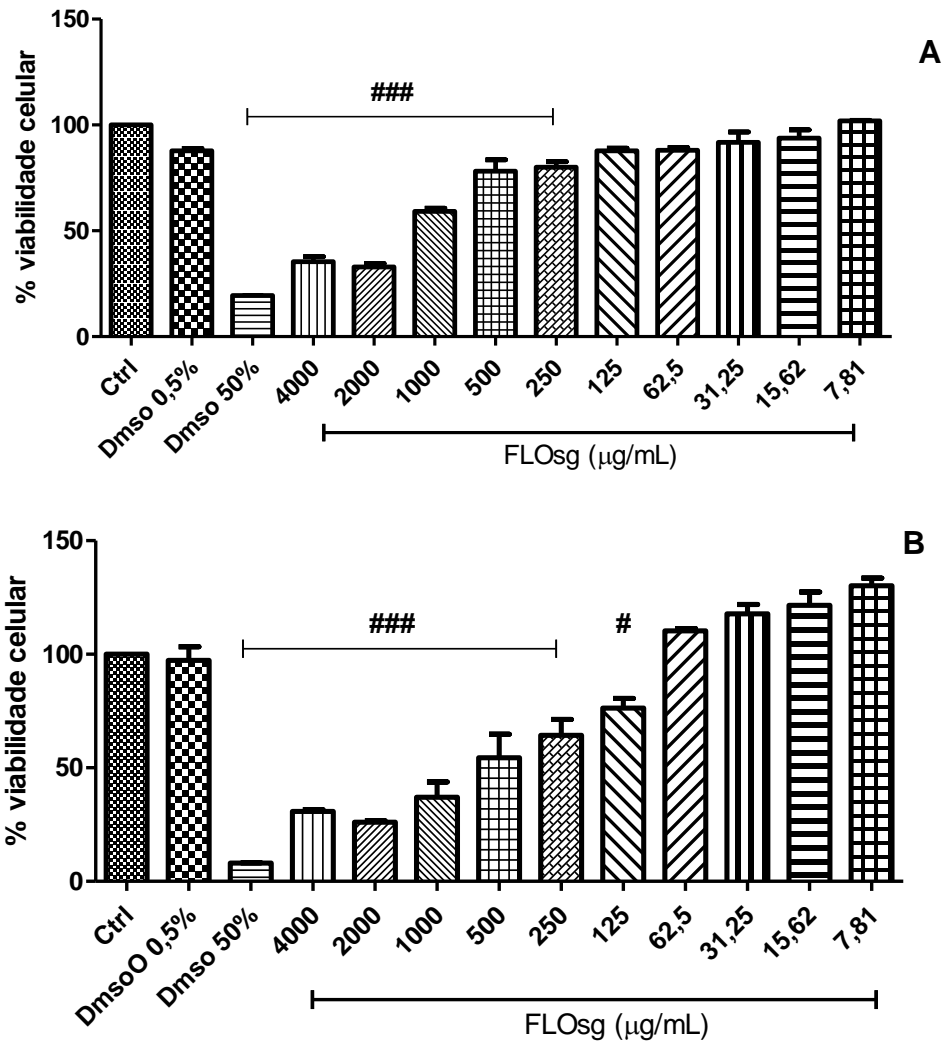
As concentrações da FLOsg entre 4000-250 µg/mL apresentaram citotoxicidade, em comparação ao grupo controle, em ambos os ensaios ($p < 0,001$, *One-Way ANOVA* e *Teste Tukey*). A concentração de 125 µg/mL no ensaio da Resazurina também apresentou diferença em relação às células controles (Figura 13-B) ($p < 0,05$). Desta forma, concentrações da FLOsg abaixo de 125 µg/mL não foram consideradas citotóxicas.

5.2.2 Viabilidade por Resazurina sódica em células de sangue total humano

A Figura 14 apresenta a ilustração da placa de cultura com os sobrenadantes da cultura de sangue total pelo ensaio da Resazurina sódica. O grupo de células DMSO 50% apresentou coloração azul/acinzentado e foi visível a coagulação das células (Figura 14- A7 a A12). A coloração mais rósea do sobrenadante da cultura sinaliza maior atividade metabólica das células e maior viabilidade. De acordo com a

ilustração da placa, foram consideradas seguras as concentrações do FLOsg menor ou igual 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 14- D7 a D12 e suas replicatas).

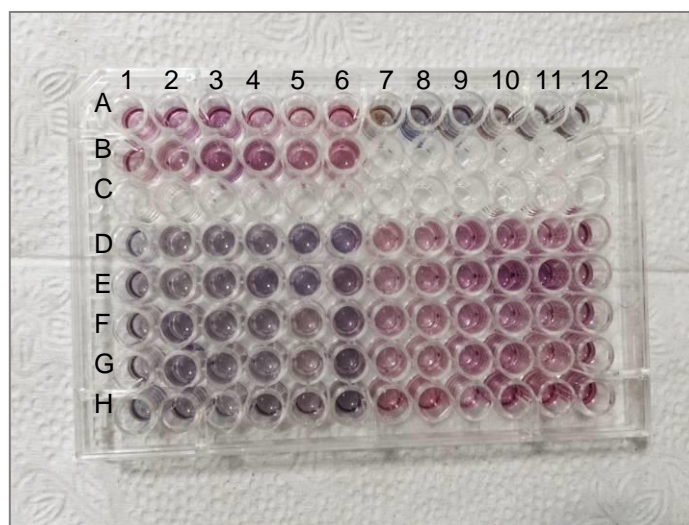
Figura 13 - Ensaios de viabilidade celular de esplenócitos *in vitro*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (A) Viabilidade por MTT-tetrazolium. (B) Viabilidade por Resazurina sódica. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. Ctrl-grupo controle com células não expostas ao FLOsg. DmsO 0,5%- grupo controle + solvente (adicionado de DMSO a 0,5%). DmsO 50%- grupo controle negativo (adicionado de DMSO 50%). 4000-7,81: células expostas a referente concentração em μg do FLOsg por mL. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (Ctrl) (###) $p < 0,001$, em relação ao grupo controle (Ctrl). *One-way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste. Dados médios oriundos de 6 replicatas para os grupos controles e 5 replicatas para as células expostas a FLOsg.

Figura 14 - Placa com sobrenadantes de cultura de sangue total exposta ou não a FLOsg com resazurina sódica após incubação *overnight*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Redução da resazurina (azul/cinza) em resofurina (rosa). Azul: menor atividade celular. Rosa: metabolismo celular ativo. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. A1 a A6- grupo controle: células de sangue total não expostas a FLOsg. A7 a A12- grupo controle negativo: células de sangue total não expostas a FLOsg + DMSO a 50%. B1 a B6- grupo controle/solvente: células de sangue total não expostas ao FLOsg + DMSO a 0,5%. D1 a D12- células de sangue total expostas a FLOsg em concentrações seriadas de 4.000 a 7,9 $\mu\text{g/mL}$. E1 a H12: replicatas pertinentes às concentrações seriadas. Dados médios oriundos de 6 replicatas para os grupos controles e 5 replicatas para as células expostas a FLOsg.

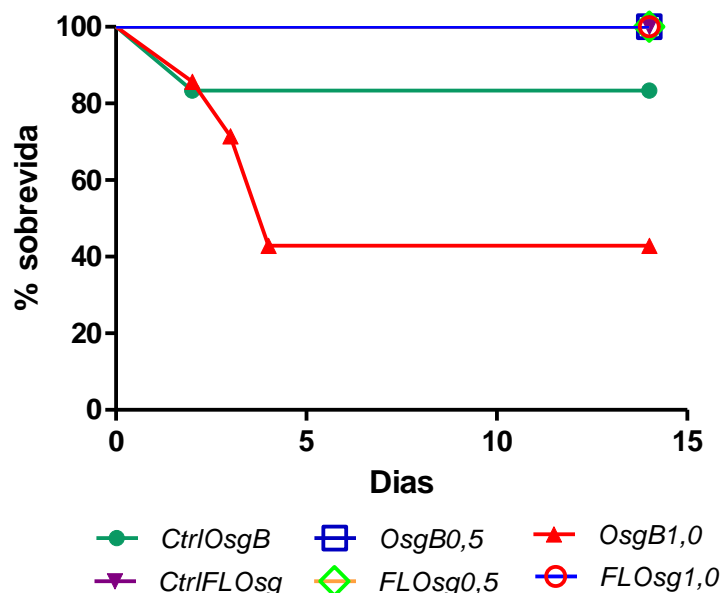
5.2.3 Avaliação da toxicidade de doses repetidas *in vivo* do OsgB e FLOsg

Compreende os aspectos que envolvem a avaliação citada.

Avaliação da sobrevivência dos animais

A Figura 15 apresenta o percentual de sobrevivência (Curva de *Kaplan-Meier*) dos animais do protocolo 1 de toxicidade *in vivo*. O grupo *OsgB1,0* apresentou importante redução da sobrevivência no início do tratamento e chegou a uma taxa menor do que 50%. No protocolo 2, todos os animais permaneceram vivos durante todo o experimento.

Figura 15 - Curva de sobrevivência dos animais dos protocolos de toxicidade de doses repetidas *in vivo* do OsgB e FLOsg.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: OsgB- óleo bruto da semente da graviola. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. *CtrlOsgB*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. *OsgB0,5*- animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. *OsgB1,0*- animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. *CtrlFLOsg*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. *FLOsg0,5*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. *OsgB1,0*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. O percentual de sobrevivência dos grupos *OsgB0,5*, *CtrlFLOsg*, *FLOsg0,5* e *FLOsg1,0* correspondem a uma mesma linha referente a 100%. Dados analisados de um total de 5 animais por grupo.

Análises físicas, bioquímicas e hematológica

A Tabela 4 apresenta os parâmetros bioquímicos e físicos avaliados no modelo experimental toxicológico *in vivo* do OsgB e FLOsg.

No protocolo do OsgB, houve diferença estatística na dosagem da glicemia do grupo *OsgB1,0*, em relação aos *CtrlOsgB* e *OsgB0,5* ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste). O grupo *OsgB1,0* também apresentou importante perda de peso (variação média de -1,2g). Em relação à aparência geral, o grupo *OsgB0,5* foi caracterizado por sinais

moderados de toxicidade (escala 1) e *OsgB1,0* com sinais mais intensos de toxicidade (escala 2).

No protocolo da FLOsg, o peso do fígado foi inversamente proporcional às doses do óleo administradas, com diferença estatística ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente para *FLOsg0,5* e *FLOsg1,0* em relação ao grupo *CtrlFLOsg*, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste). A diminuição do peso do órgão foi evidenciada pelo menor valor do peso relativo hepático (razão de 0,027). Não foram observadas outras alterações bioquímicas e físicas.

Análises histopatológicas

Compreende o detalhamento das análises supra indicadas.

Análises hepáticas

As Figuras 16 e 17 apresentam as análises histopatológicas do tecido hepático nos dois protocolos de toxicidade *in vivo*. No primeiro protocolo, a arquitetura hepática dos animais do grupo *CtrlOsgB* encontrava-se preservada com hepatócitos isomorfos, organizados em cordões, direcionados para as veias hepáticas centrolobulares e, entre estes cordões, os sinusóides hepáticos, de paredes delgadas com a presença frequente da célula de Kupffer com morfologia preservada. Os espaços portais encontravam-se regularmente distribuídos, cuja matriz apresentava a tríade portal composta de um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e um ducto biliar. Em maior aumento pôde-se observar a morfologia poligonal típica dos hepatócitos e núcleo evidente. Os hepatócitos do grupo *OsgB0,5* e *OsgB1,0* apresentavam alterações histológicas reacionais, focais e mínimas. Nestes grupos foram observadas: discreta esteatose hepática (Figura 16-B e C-circulo preto) e considerável hemossiderina. Algumas áreas hemorrágicas com necrose foram encontradas no *OsgB0,5* (Figura 16-B-seta vermelha). Em nenhuma área foi observada necrose hepatocelular e infiltrado inflamatório.

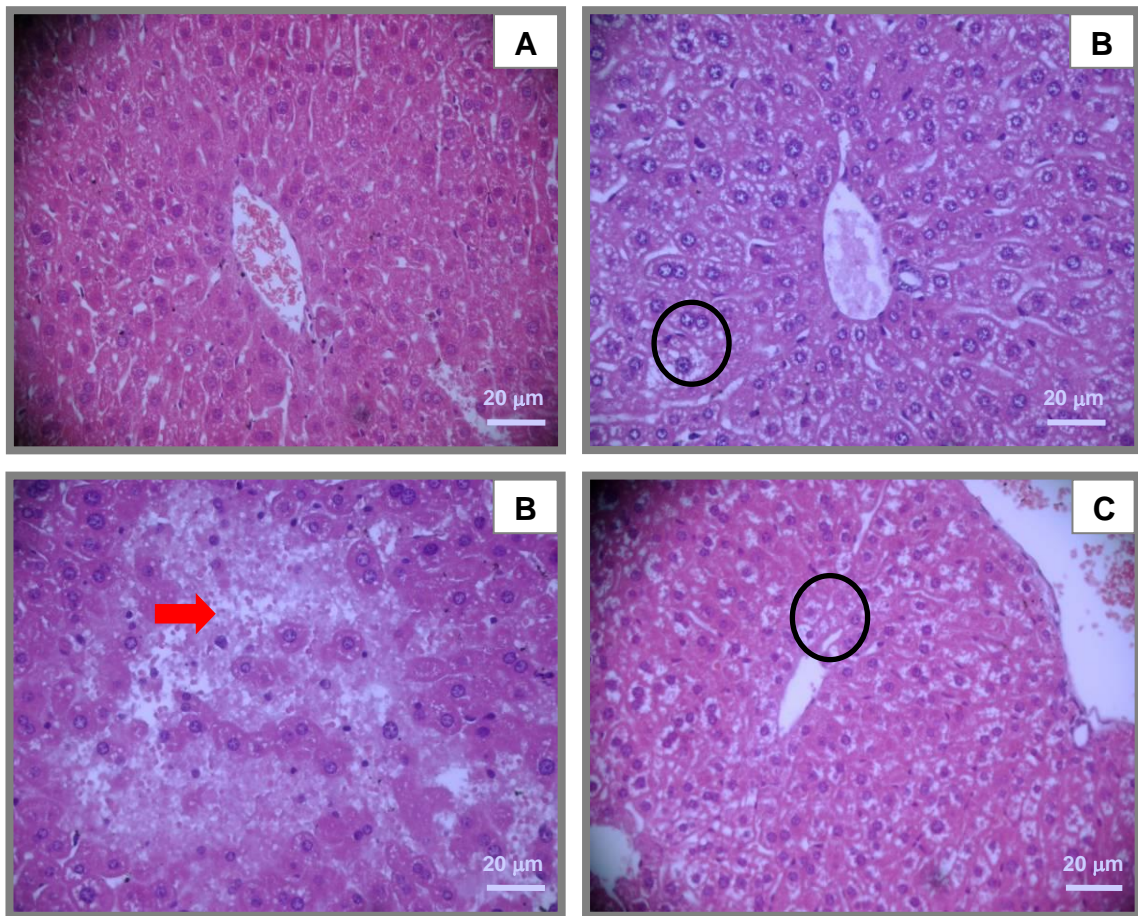
No protocolo FLOsg não foram encontrados achados histopatológicos no fígado dos três grupos (Figura 17).

Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos e físicos avaliados nos protocolos experimentais de toxicidade *in vivo* do OsgB e FLOsg.

	Protocolo OsgB			Protocolo FLOsg		
	<i>CtrlOsgB</i>	<i>OsgB0,5</i>	<i>OsgB1,0</i>	<i>CtrlFLOsg</i>	<i>FLOsg0,5</i>	<i>FLOsg1,0</i>
<i>Parâmetros bioquímicos</i>						
Glicose (mg/dL)	74,8 ±33,52	85,4 ±22,09 **	246,6 ±114,16 ###	127,4 ±51,20	198,0 ±10,56	207,2 ±34,94
Colesterol total (mg/dL)	112,4 ±29,87	149,0 ±17,50	126,2 ±32,39	103,4 ±55,34	160,6 ±37,31	174,25 ±20,63
Creatinina (mg/dL)	0,37 ±0,06	0,34 ±0,08	0,37 ±0,10	0,40 ±0,13	0,31 ±0,05	0,24 ±0,07
Uréia (mg/dL)	28,8 ±12,39	28,6 ±3,20	25,8 ±5,26	31,8 ±6,87	29,4 ±0,35	30,4 ±10,31
Leucócitos totais	1930,0 ±721,63	3900,0 ±885,3	2790,0 ±1346,9	1840,0 ±641,68	1550,0 ±583,1	2250,0 ±623,5
<i>Parâmetros físicos</i>						
Peso do fígado (g)	0,852 ±0,20	0,860 ±0,23	1,052 ± 0,18	1,00 ±0,09	0,810 ±0,09 ##	0,686 ±0,02 ###
Peso do baço (g)	0,077 ±0,01	0,066 ±0,01	0,079 ±0,03	0,087 ±0,02	0,087 ±0,01	0,079 ±0,01
Peso do animal	D[0]: 23,2 ±2,1 D[13]: 24,5 ±1,7 Variação (g): +1,3	D[0]: 23,3 ±1,2 D[13]: 24,2 ±1,7 Variação(g): +0,9	D[0]: 23,4 ±1,3 D[13]: 22,1 ±2,8 Variação (g): -1,3	D[0]: 23,8 ±1,3 D[13]: 24,5 ±0,8 Variação(g): +0,8	D[0]: 23,8 ±1,0 D[13]: 24,4 ±1,1 Variação (g): +0,6	D[0]: 25,0 ±1,2 D[13]: 25,6 ±1,1 Variação(g): +0,6
Peso relativo do fígado	0,035	0,036	0,048	0,041	0,33	0,027
Aparência geral (sinais de toxicidade)	0	1	2	0	0	0

Fonte: Dados da pesquisa. **Legenda:** Valores médios ± desvio padrão, (g) gramas. Dados apresentados oriundos de um total de 5 animais por grupo. Escala de sinais de toxicidade: (0) pelagem e aparência normal; (1) pouca alteração na pelagem e pouca caquexia e (2) pelagem alterada e caquexia. OsgB- óleo bruto da semente da graviola. FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. Protocolo OsgB: *CtrlOsgB*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. *OsgB0,5*- animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. *OsgB1,0*- animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. (###) p<0,001 em relação ao grupo *CtrlOsgB*. (**) p<0,01 em relação ao grupo *OsgB1,0*. Protocolo FLOsg: *CtrlFLOsg*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. *FLOsg0,5*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. *OsgB1,0*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. Peso relativo do fígado/razão do peso do fígado/peso corporal (##) p<0,01 e (###) p<0,001 em relação ao grupo *CtrlFLOsg*. One-Way ANOVA e Teste tukey como pós-teste.

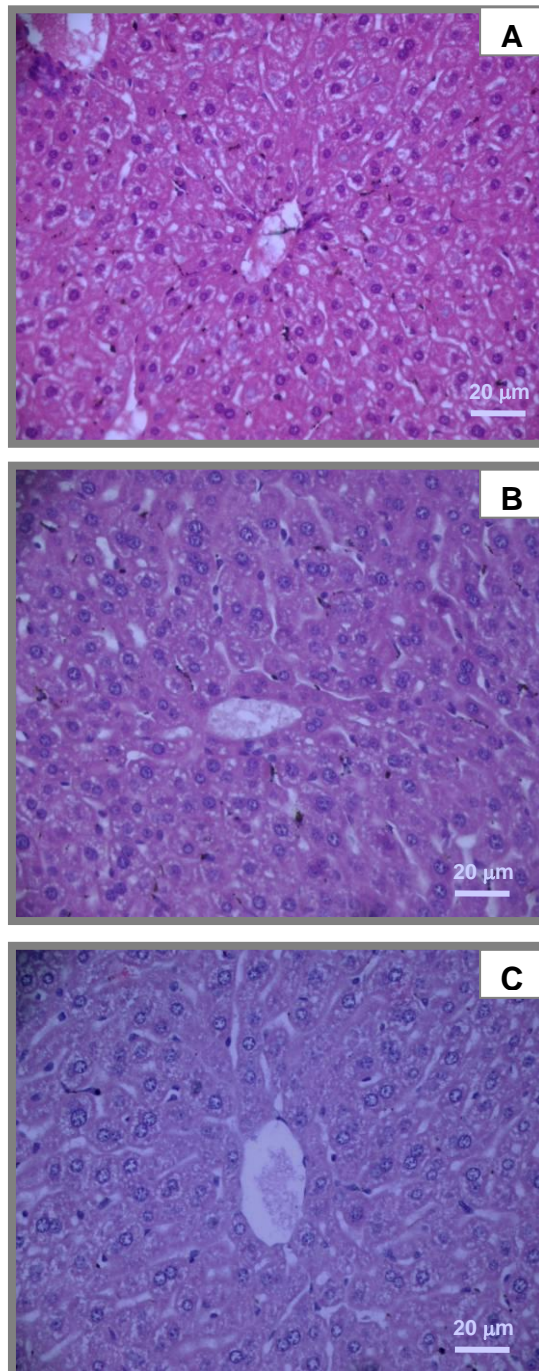
Figura 16 - Análise da histopatologia hepática dos animais do protocolo OsgB de toxicidade *in vivo* de doses repetidas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: OsgB- óleo bruto da semente da graviola. (A) *CtrlOsgB-* animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. (B) *OsgB0,5-* animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. (C) *OsgB1,0-* animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. Círculo preto: esteatose hepática. Seta vermelha: área hemorrágica com necrose. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. Coloração Hematoxilina/eosina (20µm- 400X).

Figura 17 - Análise da histopatologia hepática dos animais do protocolo FLOsg de toxicidade *in vivo* de doses repetidas.



Fonte: Dados da pesquisa.

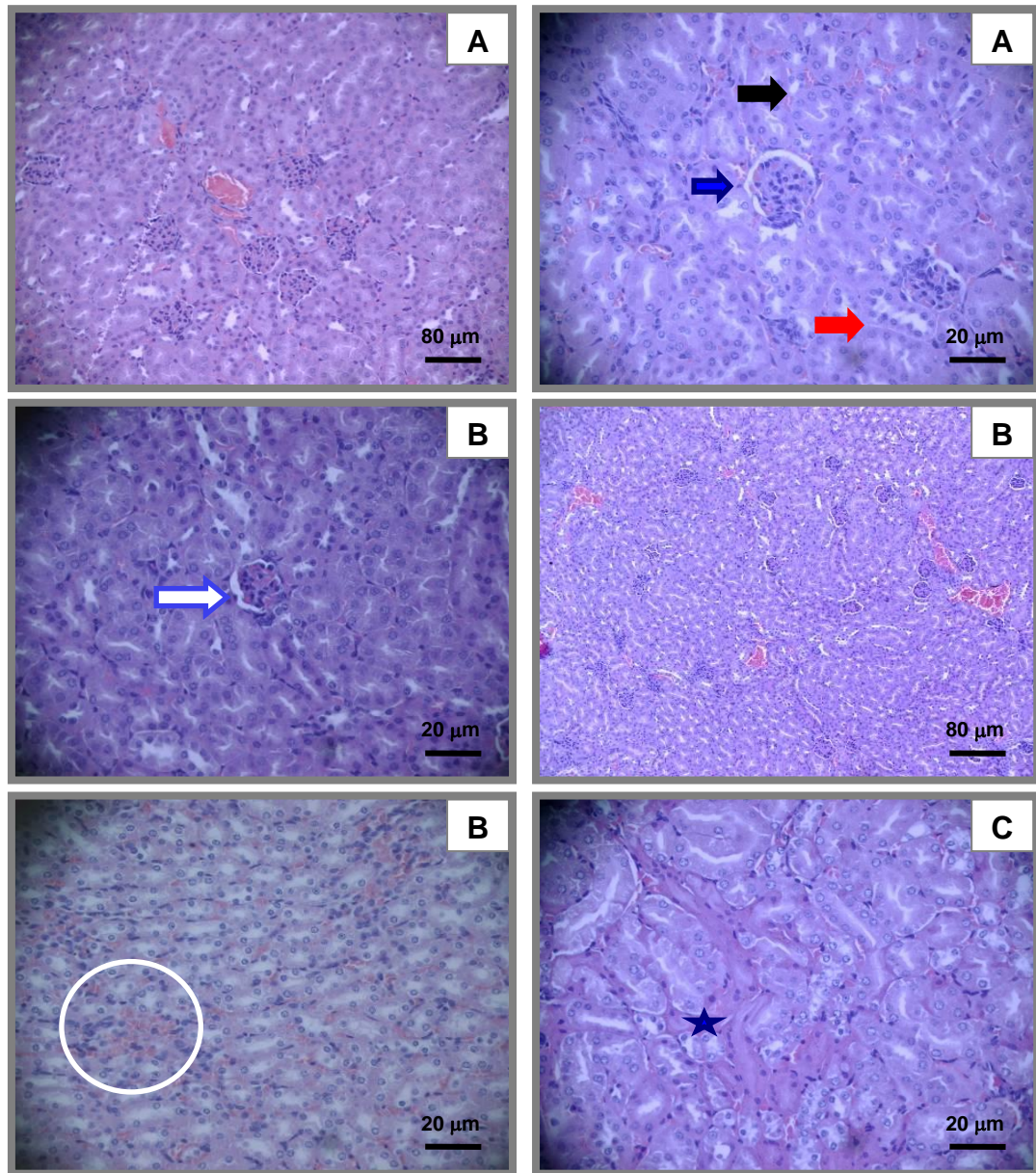
Legenda: FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) *Ctrl/FLOsg*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. (B) *FLOsg0,5*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. (C) *FLOsg1,0*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. Setas pretas: hemosiderina. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. Coloração Hematoxilina/eosina (20µm- 400X).

Análises renais

No protocolo OsgB (Figura 18), o grupo *CtrlOsgB* apresentou características de normalidade do parênquima renal. No menor aumento (100x), pôde-se observar o córtex, mais interno, fortemente eosinofílico pela abundância de túbulos contorcidos proximais e corpúsculos renais bem distribuídos e uniformes. No maior aumento (400x), observou-se com mais detalhes os glomérulos que se apresentam envolvidos por fina cápsula de Bowman e tubo capilar sustentado por delicado mesângio, descartando características de glomerulonefrite (Figura 18-A). Os túbulos contorcidos proximais abundantes, próximos aos glomérulos, apresentavam epitélio cúbico preservado e citoplasma fortemente eosinofílico que se diferenciava dos túbulos contorcidos distais, com menor eosinofilia citoplasmática e lúmen mais amplo. Os animais do grupo *OsgB0,5* tinham características semelhantes, no entanto, os glomérulos se apresentaram com discreta atrofia e restrito espaço de Bowman (Figura 18-B, seta azul), além da presença de capilares hiperemiados na área medular entre os túbulos coletores (Figura 18-B, círculo). Os animais do grupo *OsgB1,0* apresentaram alguns túbulos com citoplasma mais eosinofílicos, presença de precipitados, núcleos mais basofílicos associados a áreas com cariólise, característica de necrose coagulativa tubular (Figura 18-C, asterisco). Em nenhum animal foi encontrado áreas de infiltrado inflamatório.

No protocolo FLOsg (Figura 19), nos três grupos *CtrlFLOsg*, *FLOsg0,5* e *FLOsg1,0*, pôde-se observar características morfológicas bem semelhantes, com aspecto de normalidade renal e ausência de achados histopatológicos. Na zona cortical, glomérulos com tamanhos proporcionais, presença de cápsula e espaço de Bowman, epitélio tubular simples cúbico e íntegro, e na zona medular, os túbulos coletores normais entre os diversos capilares sanguíneos, apresentando epitélio cúbico a colunar baixo com lúmen bem visível.

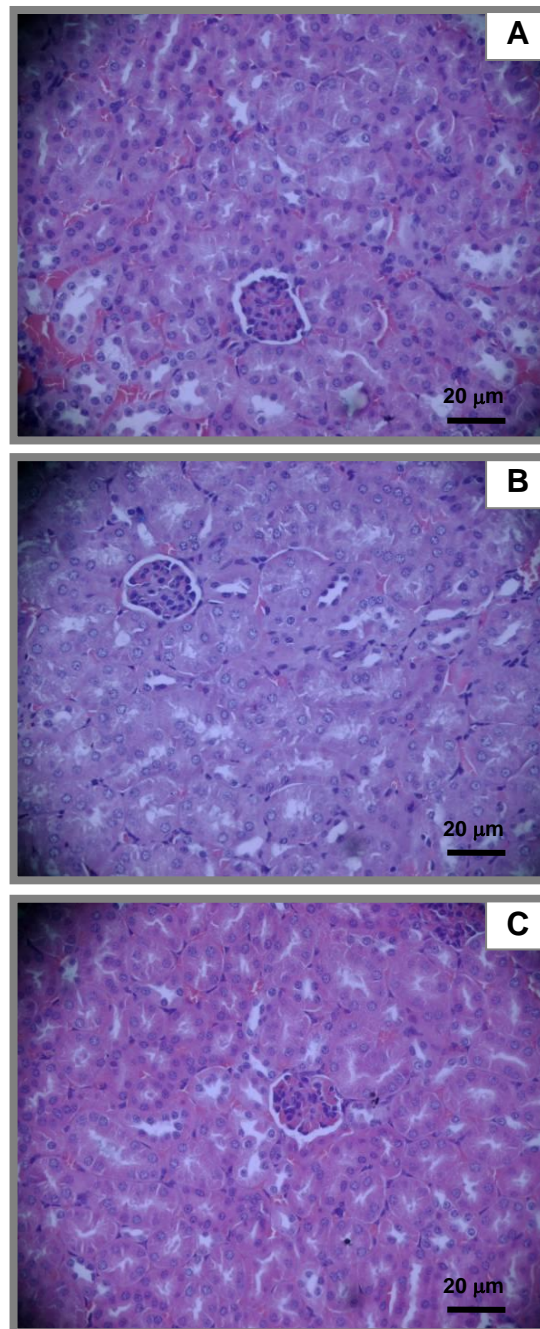
Figura 18 - Análise da histopatologia renal dos animais do protocolo OsgB de toxicidade *in vivo* de doses repetidas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: OsgB- óleo bruto da semente da graviola. (A) *CtrlOsgB*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. (B) *OsgB0,5*- animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. (C) *OsgB1,0*- animais que receberam óleo bruto da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. (A) Seta preta: túbulo contorcido proximal. Seta azul: glomérulo. Seta vermelha: túbulo contorcido distal. (B) Seta branca: glomérulo atrofiado; Círculo: capilares hiperemiados na área medular. (C) Asterisco: cariólise e necrose coagulativa tubular com precipitados. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. Coloração Hematoxilina/eosina (20μm- 400X) (80μm- 100X).

Figura 19 - Análise da histopatologia renal dos animais do protocolo FLOsg de toxicidade *in vivo* de doses repetidas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: FLOsg- fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) *CtrlFLOsg*- animais que receberam salina + DMSO 0,5%, via oral. (B) *FLOsg0,5*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 0,5mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. (C) *FLOsg1,0*- animais que receberam a fração líquida do óleo da semente da graviola na dose de 1,0 mL/Kg peso + DMSO a 0,5%, via oral. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. Coloração Hematoxilina/eosina (20µm- 400X).

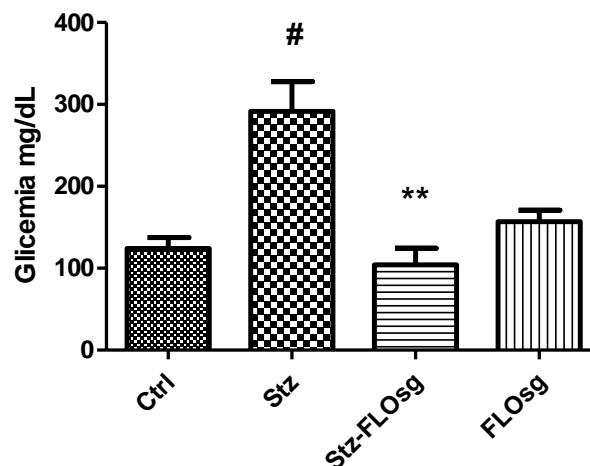
5.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADORES DO FLOSG EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELITO TIPO 1.

Abordam-se, aqui, os resultados obtidos do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 in vivo e in vitro

5.3.1 Dosagem de glicemia e insulina sérica

A Figura 20 apresenta as dosagens da glicemia em jejum (8 horas) dos animais do protocolo experimental do DM autoimune. O grupo *Stz* apresentou diferença significativa em comparação ao grupo *Ctrl* ($p < 0,05$, *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste). O grupo *Stz-FLOsg* apresentou diferença significativa em comparação ao grupo *Stz* ($p < 0,01$, *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste). Não houve diferença estatística entre os grupos *Ctrl*, *Stz-FLOsg* e *FLOsg*. O tratamento com FLOsg promoveu efeito antihiper-glicêmico no DM induzido.

Figura 20 - Glicemia em jejum dos grupos dos animais do protocolo experimental do diabetes melito tipo 1.

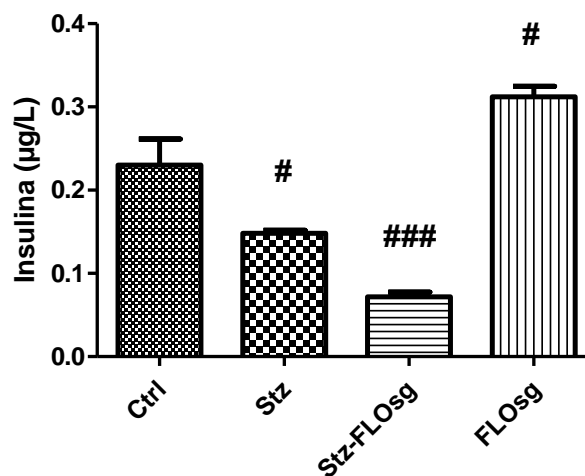


Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. Dados apresentados oriundos de um total de 5 animais por grupo. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (*Ctrl*). (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo *Stz*. *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste.

A Figura 21 apresenta as dosagens da insulina sérica dos animais do protocolo experimental do DM autoimune. Todos os grupos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo *Ctrl*. Os grupos *Stz* e *Stz-FLOsg* apresentaram redução da insulina sérica ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste). O grupo *FLOsg* apresentou maior quantidade de insulina serica ($p < 0,01$, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste).

Figura 21 - Insulina sérica dos grupos dos animais do protocolo experimental do diabetes melito tipo 1.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. Dados apresentados oriundos de um total de 5 animais por grupo. (#) $p < 0,05$ e (###) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (*Ctrl*). *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste.

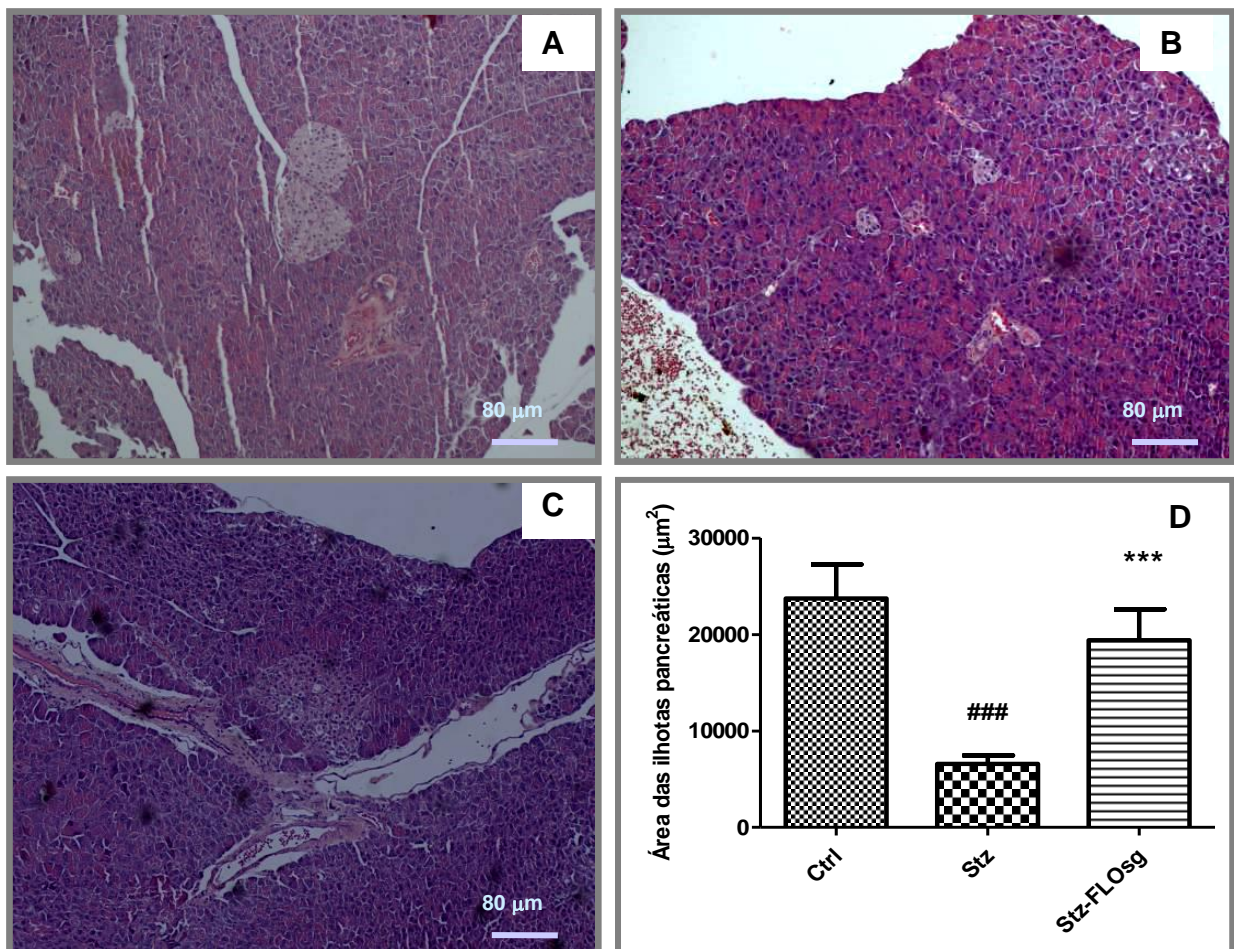
5.3.2 Análises histológicas

Apresentam-se as especificidades das análises histológicas.

Análises pancreáticas

A Figura 22 apresenta as áreas das ilhotas do pâncreas (μm^2) e as imagens histológicas representativas das ilhotas pancreáticas por grupo experimental do protocolo experimental do DM autoimune. O Grupo *Ctrl* apresentou estrutura pancreática preservada com grandes ilhotas (Figura 22-D). O grupo *Stz* apresentou atrofia e diminuição da área das ilhotas (Figura 22-B e D), com perda de área significativa ($p < 0,001$, *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste). O grupo *Stz-FLOsg* apresentou diferença significativa em relação aos animais *Stz* ($p < 0,001$, *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste), com maior extensão da área calculada das ilhotas.

Figura 22 - Análise histopatológica do tecido pancreático dos animais do protocolo experimental do diabetes melito tipo 1.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. (B) *Stz*- animais

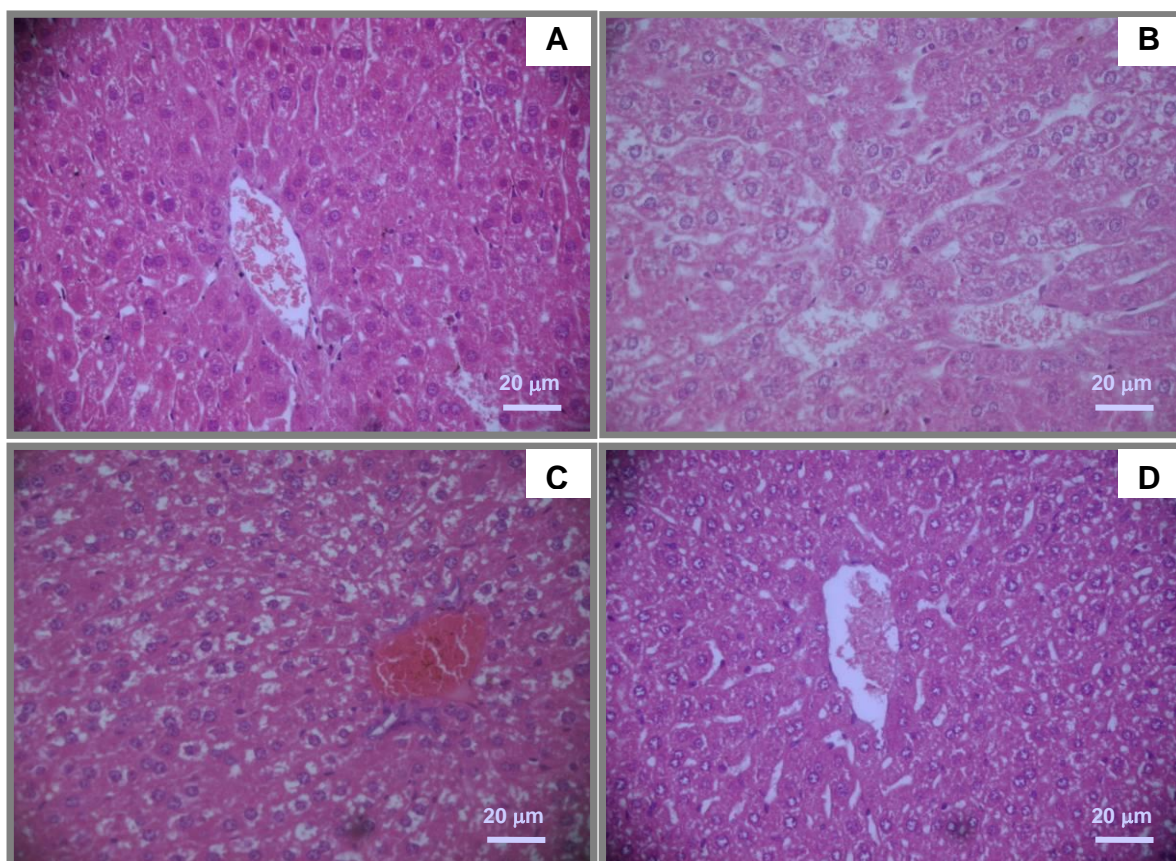
que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (C) *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (D) Área das ilhotas pancreáticas em μm^2 dos grupos dos animais do protocolo experimental do diabetes melito autoimune. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. (###) $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (*Ctrl*). (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo *Stz*. *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste. Coloração hematoxilina/eosina (80 μm -100X).

Análises hepatológicas

A Figura 23 apresenta imagens representativas de cortes hepáticos corados com hematoxilina/eosina. De acordo com a análise das lâminas, pode-se observar a organização do parênquima hepático com espaço porta e cordões de hepatócitos, divergindo da veia centro lobular (Figura 23-A)

Os animais do grupo *Stz* apresentaram pouca diferença em relação ao grupo *Ctrl*, apenas alguns hepatócitos apresentaram discreta degeneração celular, sem perda da organização hepática (Figura 23-B). Os animais do grupo *Stz-FLOsg* e *FLOsg* apresentaram características morfológicas semelhantes ao grupo *Ctrl*, sem alterações.

Figura 23 - Tecido hepático dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 corado por Hematoxilina/eosina.

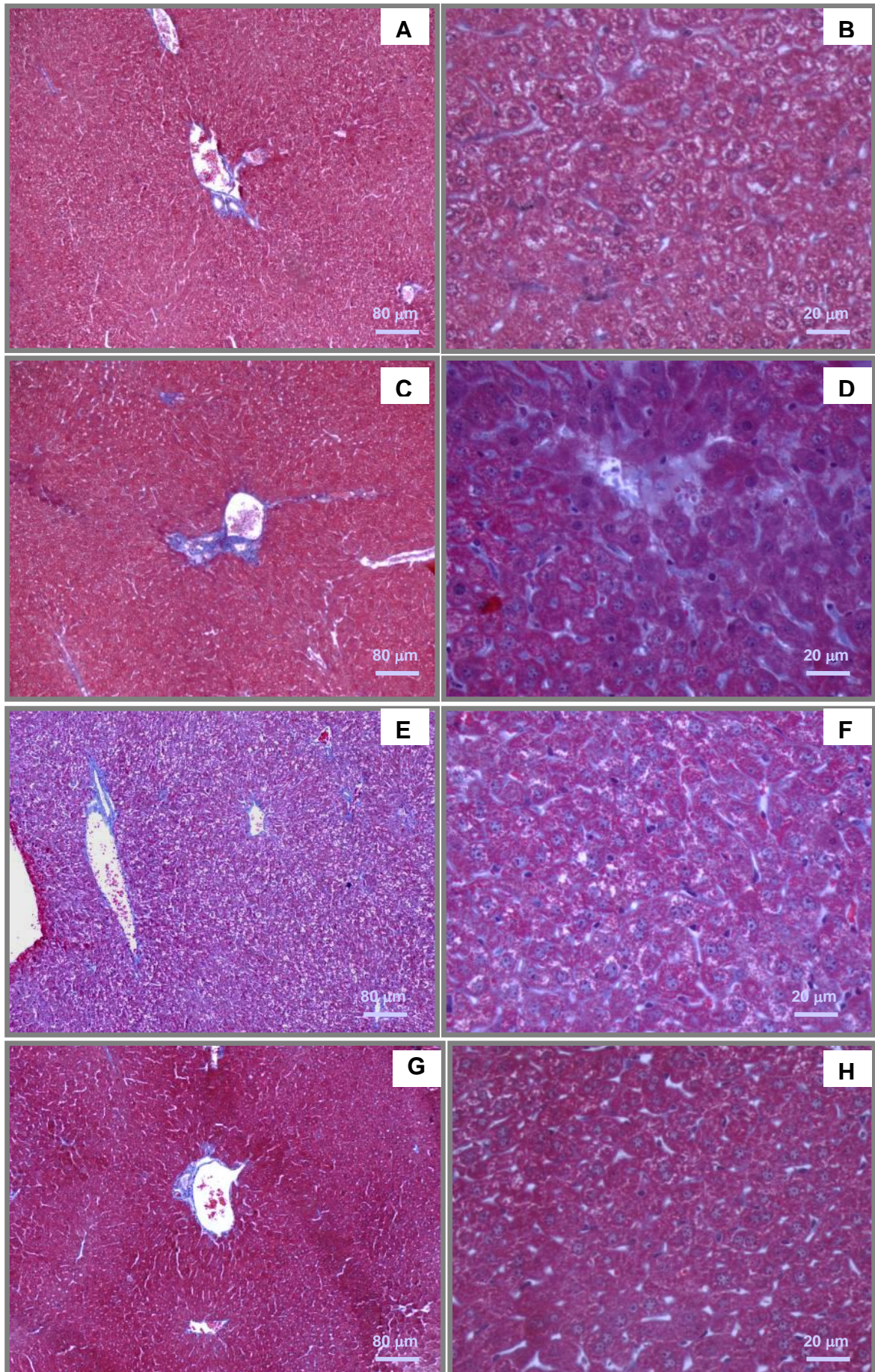


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. (B) *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (C) *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (D) *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. (20µm-400X).

A Figura 24 apresenta imagens representativas dos cortes hepáticos corados com Tricrômio de Masson. As imagens refletem a presença de fibras no espaço porta e entre os hepatócitos. De acordo com a análise das lâminas, observou-se que o fígado dos animais do grupo *Stz* (Figura 24-D, E e F) apresentaram um maior depósito de fibras, quando comparado ao grupo *Ctrl* (Figura 24- A, B e C), tanto no espaço porta, como entre os hepatócitos. Observou-se que o tratamento com OSG foi capaz de diminuir o depósito de fibras (Grupo *Stz-Osg*, Figura 24-G e H) em relação ao grupo *Stz*. Não foram observadas diferenças estruturais do grupo *Osg* (Figura 25- I e J) em relação ao grupo *Ctrl* quanto ao depósito de fibras.

Figura 24 - Tecido hepático dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 corado por Tricrômio de Masson.

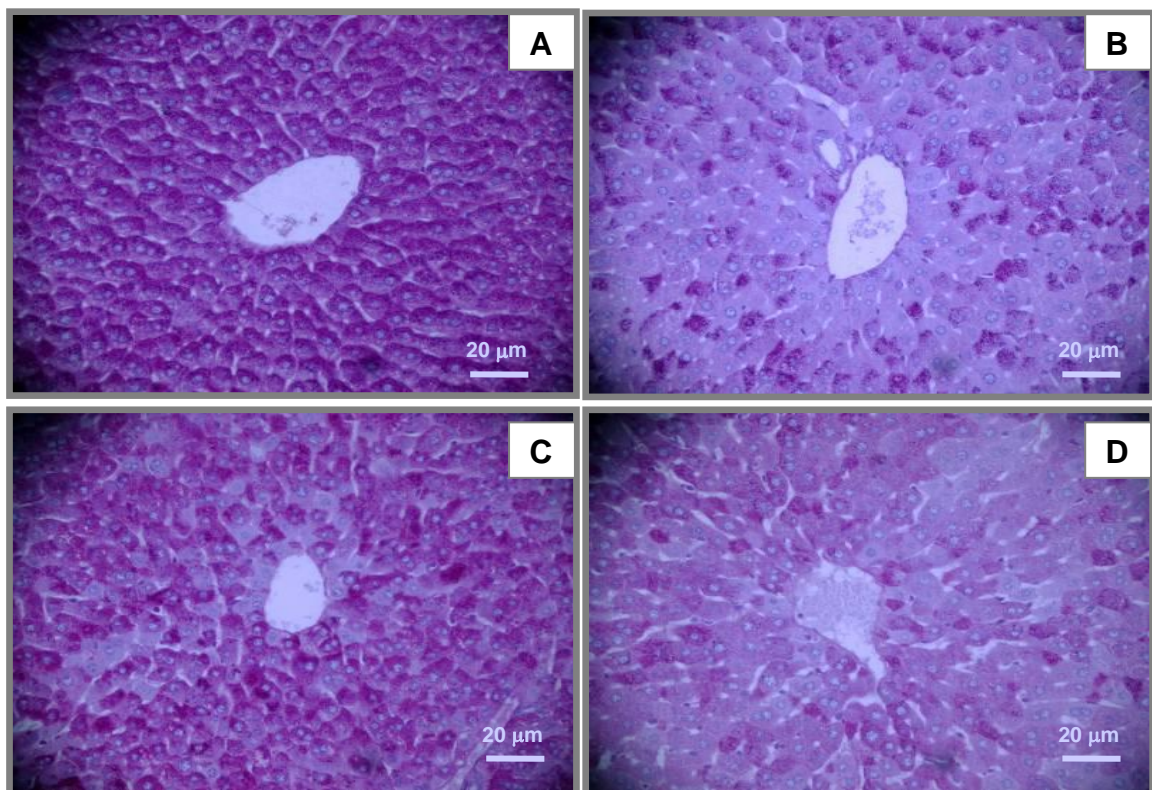


Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) e (B) *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. (C) e (D) *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (E) e (F) *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (G) e (H) *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. (80µm-100X). (20µm-400X).

A Figura 25 apresenta imagens do tecido hepático dos animais do protocolo de diabetes melito, corados com Ácido Periódico de Shif (PAS). A avaliação das imagens indicou que o grupo *Ctrl* apresentou morfologia e depósito de glicogênio normal, de acordo com intensidade de coloração do citoplasma dos hepatócitos. O grupo *Stz* apresentou perda do depósito de glicogênio. O grupo *Stz-FLOsg* apresentou recuperação parcial do glicogênio, porém, uma recuperação visível em comparação ao grupo *Stz*. O grupo *FLOsg* apresentou morfologia semelhante ao grupo *Stz*, indicando que o FLOsg afetou deposição/estoque de glicogênio.

Figura 25 - Tecido hepático dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1 corado por Ácido Periódico de Shif (PAS).



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. (B) *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (C) *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (D) *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. Foram avaliadas as lâminas de um total de 5 animais por grupo. (20µm-400X).

5.3.3 Parâmetros bioquímicos e físicos

A Tabela 5 apresenta os dados bioquímicos e físicos dos animais do protocolo experimental de DM. Houve aumento significativo da alanina transaminase (ALT) nos animais do grupo *Stz*, em relação aos grupos *Ctrl* e *FLOsg* ($p < 0,05$, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste). Não houve diferença significativa nos níveis da creatinina. No entanto, foi observado um aumento da creatinina no grupo *Stz*, em comparação aos demais grupos.

Os animais do grupo *Stz-FLOsg* apresentaram um menor peso do fígado significativo, em relação aos grupos *Ctrl* e *Stz* ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste). No entanto, esta redução não foi evidenciada no peso relativo do fígado, no qual foi obtido um valor próximo aos dos demais grupos, o que confirma que a redução do órgão foi proporcional à redução do peso corporal. Em relação à aparência geral, os animais do grupo *Stz* apresentaram discretas alterações físicas, com pouca perda de peso (Tabela 5) e pouca alteração da pelagem (Figura 26-B). No entanto, o grupo *Stz-FLOsg* apresentou uma importante caquexia, com variação de peso negativa e alteração da pelagem (Tabela 5 e Figura 26-C). Os animais do grupo *FLOsg* não apresentaram sinais e alterações físicas (Figura 26-D).

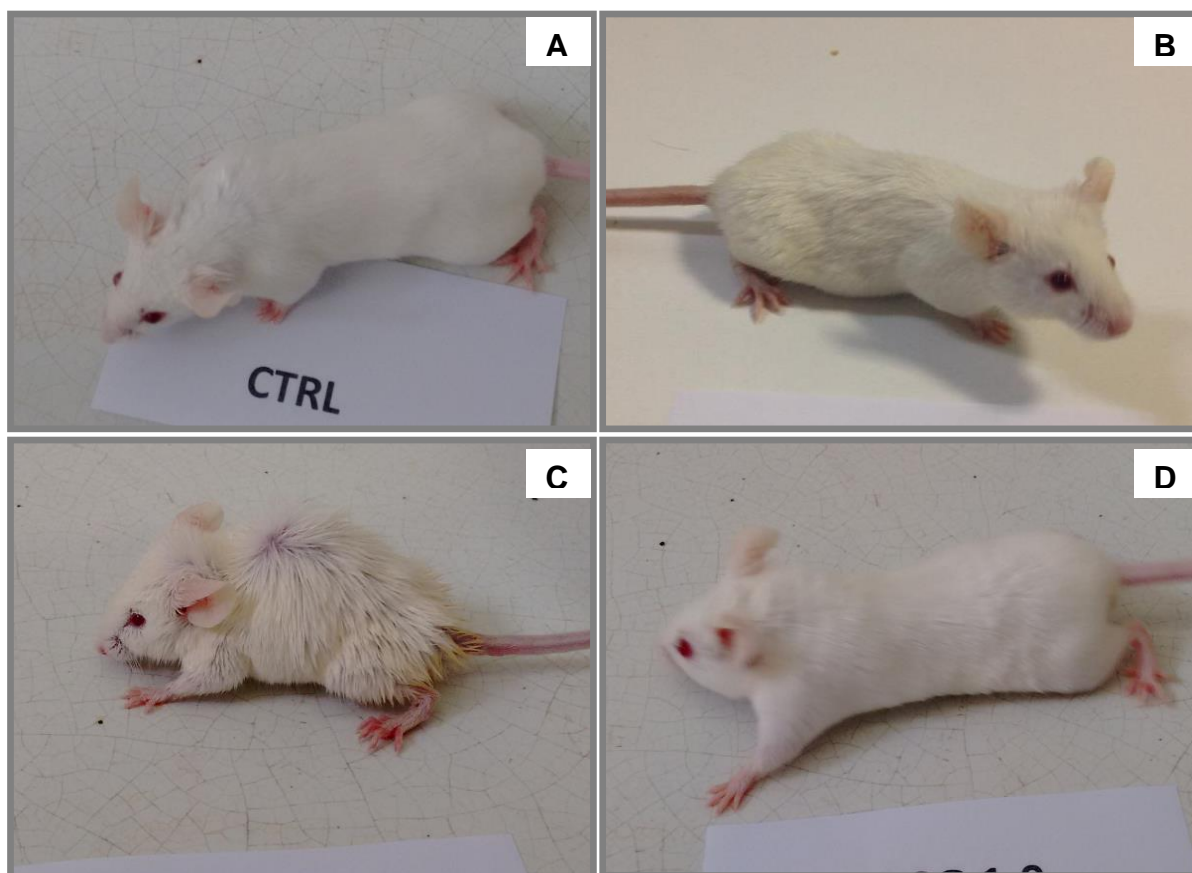
Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos e físicos avaliados no protocolo experimental de diabetes melito tipo 1.

	<i>Ctrl</i>	<i>Stz</i>	<i>Stz-FLOsg</i>	<i>FLOsg</i>
<i>Parâmetros bioquímicos</i>				
Alanina transaminase (ALT) (UI/L)	58,2 ±31,96	313,8 ±148,5 #	238 ±193,6	47,8 ±28,8
Creatinina (mg/dL)	0,3 ±0,07	0,65 ±0,9	0,2 ±0,05	0,26 ±0,13
<i>Parâmetros físicos</i>				
Peso fígado (g)	1,23 ±0,16	1,38 ±0,2	0,77 ±0,3 ## ***	1,15 ±0,06
Aparência geral	0	1	2	0
Peso corporal (g)	D[0]: 25,2±1,1 D[47]: 27,0±0,7 Variação (g): +1,8	D[0]: 25,6±1,2 D[47]: 25,5±2,5 Variação (g): -0,1	D[0]: 24,4±1,3 D[47]: 16,4±0,9 Variação(g): -8,0	D[0]: 25,2±0,3 D[47]: 26,4±1,14 Variação (g): +1,2
Peso hepático relativo	0,045	0,05	0,047	0,044

Fonte: Dados da pesquisa.

Valores médios ± desvio padrão. FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. Escala de alterações físicas (aparência geral): (0) pelagem e aparência normal; (1) pouca alteração na pelagem e pouca caquexia e (2) pelagem alterada e caquexia. Peso hepático relativo- Razão peso fígado/ peso corporal. Dados apresentados obtidos de um total de 5 animais por grupo. (#) $p < 0,05$ e (##) $p < 0,01$ em relação ao grupo *Ctrl*. (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo *Stz*. *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste.

Figura 26 - Registro fotográfico dos animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1.



Fonte: Fotos sacadas pela autora.

Legenda: FLOsg- a fração líquida do óleo da semente da graviola. (A) *Ctrl*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. (B) *Stz*- animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (C) *Stz-FLOsg*- animais que receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. (D) *FLOsg*: receberam a FLOsg na dose de 1,0mL/Kg peso diariamente + DMSO 0,5% por via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias.

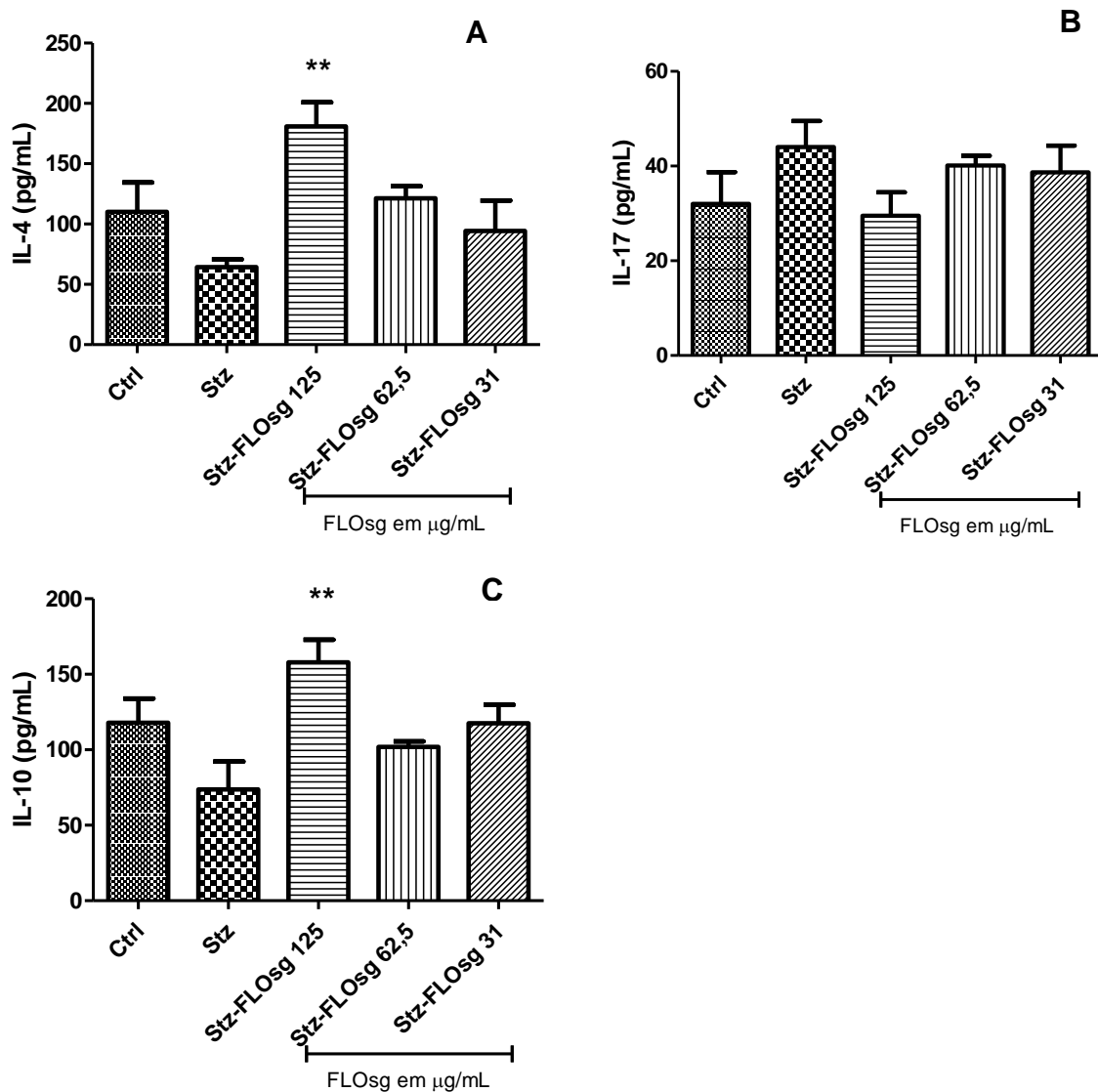
5.3.4 Ensaio *in vitro* de produção de citocinas (IL-10, IL-17, IL-4)

A Figura 27 apresenta as dosagens das citocinas avaliadas nos sobrenadantes da cultura de esplenócitos, realizada com animais do grupo *Stz*, na ausência e presença do FLOsg na concentração de 125, 62,5 e 31 $\mu\text{g/mL}$ e do grupo *Ctrl*.

Em todas as citocinas dosadas, não houve diferença entre o grupo *Ctrl* e *Stz*. As células expostas a uma concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ (*Stz-FLOsg* 125) apresentaram

um aumento significativo da IL-4 e IL-10, em relação ao grupo *Stz*, não exposto ($p < 0,01$, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste, respectivamente) (Figura 27-A e C). Nas dosagens da IL-17, não foram observadas diferenças significantes entre a células expostas ou não ao FLOsg.

Figura 27 - Dosagens das citocinas em sobrenadantes de cultura de esplenócitos de animais do protocolo experimental de diabetes melito tipo 1.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (A) Dosagens de IL-4. (B) Dosagens de IL-17. (C) Dosagens de IL-10. *Ctrl*- esplenócitos dos animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e tampão citrato via i.p, por 3 dias. *Stz*- esplenócitos dos animais que receberam salina + DMSO 0,5% via oral e STZ a 100 mg/Kg via i.p, por 3 dias. *Stz-FLOsg 125*- esplenócitos dos animais *Stz* expostas a FLOsg na concentração de 125 μ g/mL. *Stz-FLOsg 62,5*- esplenócitos dos animais *Stz* expostas a FLOsg na concentração de 62,5 μ g/mL. *Stz-FLOsg 31*- esplenócitos dos animais

Stz expostas a FLOsg na concentração de 31µg/mL. (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo Stz. *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste. Dados oriundos de 6 replicatas por grupo.

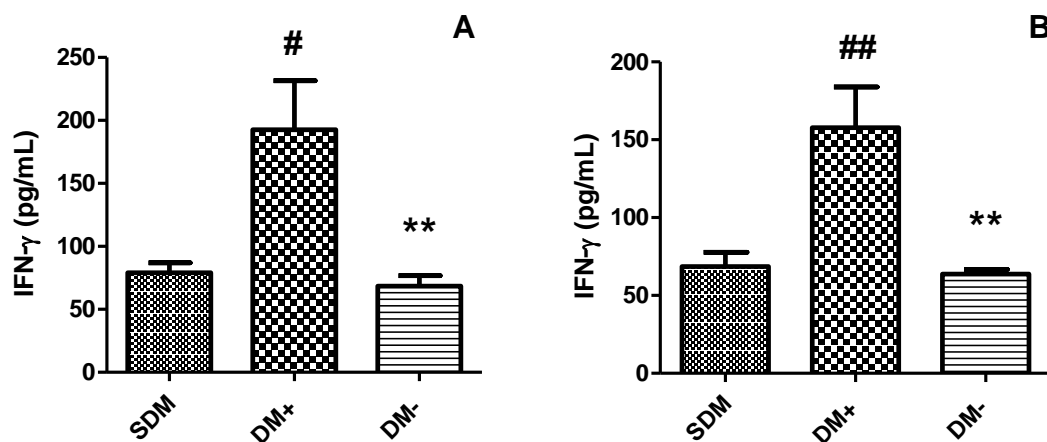
5.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR *IN VITRO* DO FLOSG EM CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM DM1

Os pacientes controles sem diabetes (SDM) apresentaram parâmetros negativos e não reagentes nos exames dos autoanticorpos. Em relação ao total dos pacientes diabéticos selecionados, todos apresentaram reação positiva para pelo menos um anticorpo avaliado; destes, 3 pacientes apresentaram reação positiva para dois anticorpos e 3 apresentaram reação positiva para todos os anticorpos avaliados (valores de referência: anti-GAD e anti-IA2 $\geq 10,0$ UI/mL e anti-insulina $> 8,6\%$). Dessa forma, nenhum indivíduo SDM e DM foi excluído do estudo.

Alguns pacientes diabéticos apresentaram um perfil mais responsivo à produção espontânea de IFN- γ , devido a maiores dosagens detectadas. Os valores identificados nos pacientes DM corresponderam a um intervalo de 48,7 a 350,7 pg/mL. Assim, os pacientes DM foram classificados como diabéticos altos produtores de IFN- γ (DM+) e diabéticos baixos produtores de IFN- γ (DM-). Para o grupo DM+ foram considerados os seis maiores valores identificados, que corresponderam aos intervalos de 111 a 350,7 pg/mL, no período de 24h, e 100 a 241,1 pg/mL, no período de 72h. Para o grupo DM- foram considerados os seis menores valores identificados, que corresponderam aos intervalos 48,7 a 99,5 pg/mL, no período de 24h, e 53,7 a 75,1 pg/mL, no período de 72h.

A Figura 28 apresenta as dosagens de IFN- γ dos sobrenadantes das culturas de sangue total, não expostas a FLOsg, dos pacientes sem diabetes (SDM), dos diabéticos altos produtores de IFN- γ (DM+) e diabéticos baixos produtores de IFN- γ (DM-). O grupo DM+ apresentou diferença significativa entre os grupos SDM e o DM- ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, em 24h e $p < 0,001$ em 72h, *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste). Desta forma, a produção do IFN- γ das células expostas ao FLOsg foi avaliada conforme a divisão dos grupos (SDM, DM+ e DM-) e a responsividade à esta citocina.

Figura 28 - Comparação das dosagens *in vitro* de IFN- γ (pg/mL) em pacientes controles sem diabetes melitos (SDM), diabéticos altos produtores de IFN- γ (DM+) e baixos produtores de IFN- γ (DM-).



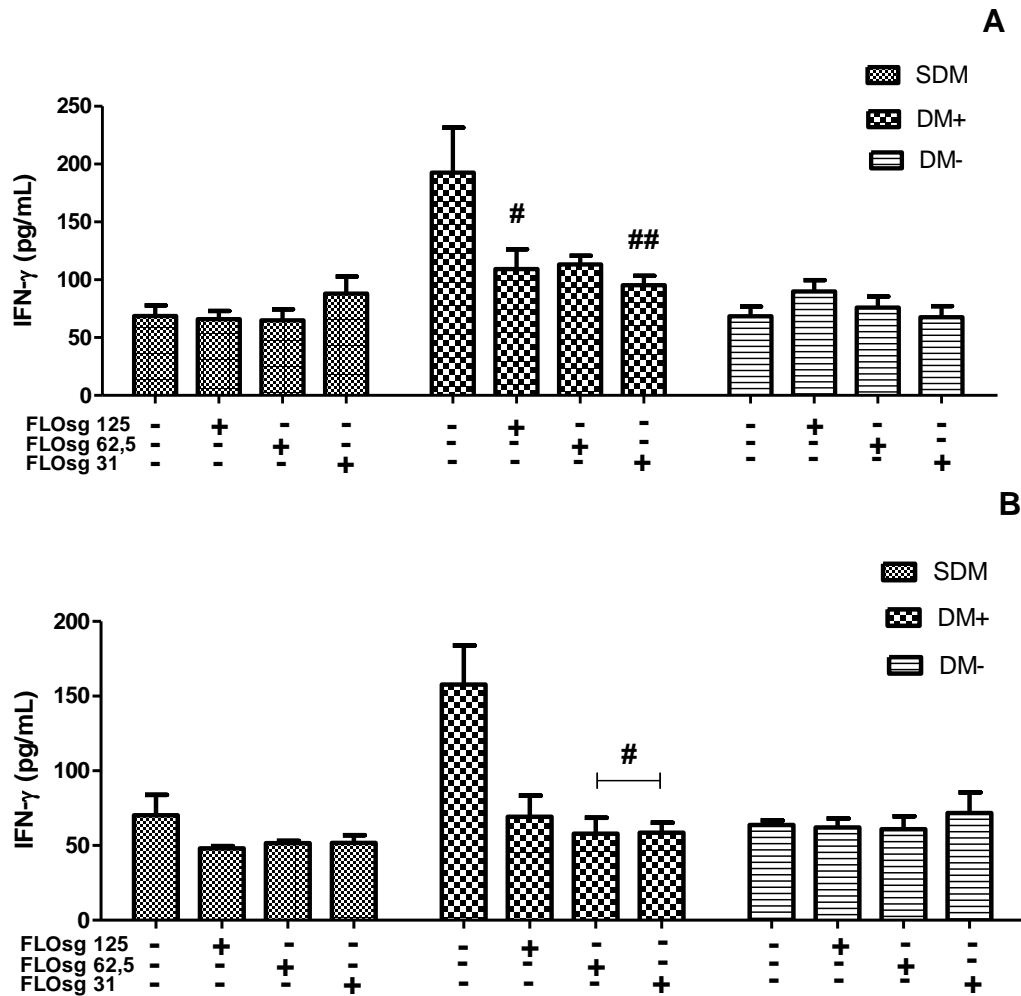
Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: (A) cultura de sangue total no período de 24h. (B) cultura de sangue total no período de 72h. (#) $p < 0,05$ e (##) $p < 0,01$ em relação ao grupo SDM. (**) $p < 0,01$ em relação ao grupo DM+. *One-Way ANOVA* e Teste *Tukey* como pós-teste. Dados de 6 indivíduos por grupo.

A Figura 29 apresenta as dosagens do IFN- γ nos grupos SDM, DM+ e DM- não expostos e expostos a FLOsg. No período de incubação de 24h, a FLOsg, nas concentrações de 125 e 31 μ g/mL, reduziu de forma significativa a produção de IFN- γ nos DM+ ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste) em relação às células não expostas do mesmo grupo (Figura 29-A). No período de incubação de 72h, a FLOsg também reduziu de forma significativa a produção de IFN- γ nos DM+, nas concentrações de 62,5 e 31 μ g/mL ($p < 0,05$, *Kruskal-Wallis* e Teste de *Dunn* como pós-teste) em relação às células não expostas do mesmo grupo (Figura 29-B).

As dosagens da IL-10 (pg/mL) nos sobrenadantes das culturas de sangue total (período de 24h) dos pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM), não expostas a FLOsg, estão apresentadas na Figura 30. O grupo DM apresentou níveis mais baixos significantes em relação ao grupo SDM ($p < 0,05$, Teste *t de Student*) (Figura 30).

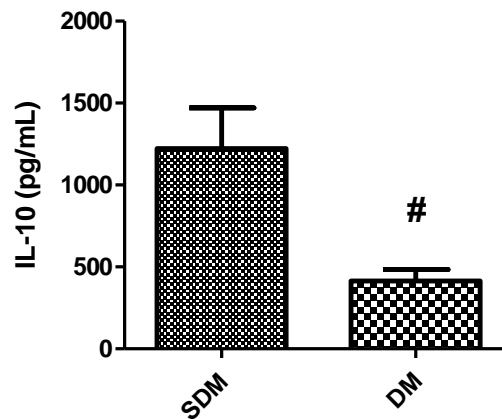
Figura 29 - Comparação das dosagens *in vitro* de IFN- γ (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de sangue periférico de pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM).



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (DM+): diabéticos mais responsivos à produção do IFN- γ . (DM-): diabéticos menos responsivos à produção do IFN- γ . (FLOsg 125): células expostas ao OSG na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$. (FLOsg62): células expostas ao OSG na concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$. (FLOsg31): células expostas ao OSG na concentração de 31 $\mu\text{g/mL}$. (A) cultura de sangue total no período de 24h. (B) cultura de sangue total no período de 72h.(#) $p < 0,05$ e (##) $p < 0,01$ em relação às células não expostas (DM+). *Kruskal-Wallis* e Teste *Dunn's* como pós-teste. Dados de 6 indivíduos por grupo.

Figura 30 - Comparação das dosagens *in vitro* de IL-10 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de sangue periférico de pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM).

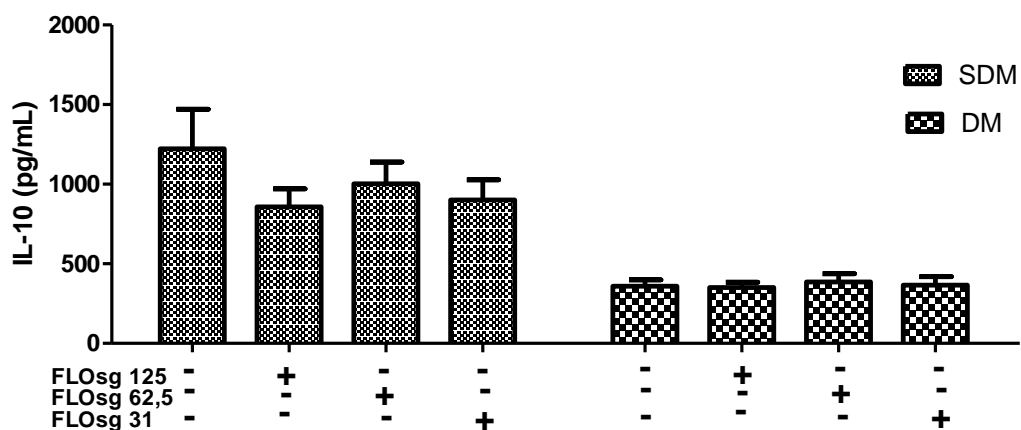


Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Cultura de sangue total no período de 24h. (#) $p < 0,05$ em relação ao grupo SDM. Teste *t* de Student. SDM- 6 indivíduos. DM- 12 indivíduos.

A Figura 31 apresenta as dosagens da IL-10 nos grupos SDM e DM não expostos e expostos a FLOsg. Não houve diferença significativa na produção dessa citocina entre as células expostas ou não.

Figura 31 - Comparação das dosagens *in vitro* de IL-10 (pg/mL) em sobrenadantes de culturas de sangue periférico de pacientes sem diabetes (SDM) e com diabetes (DM).

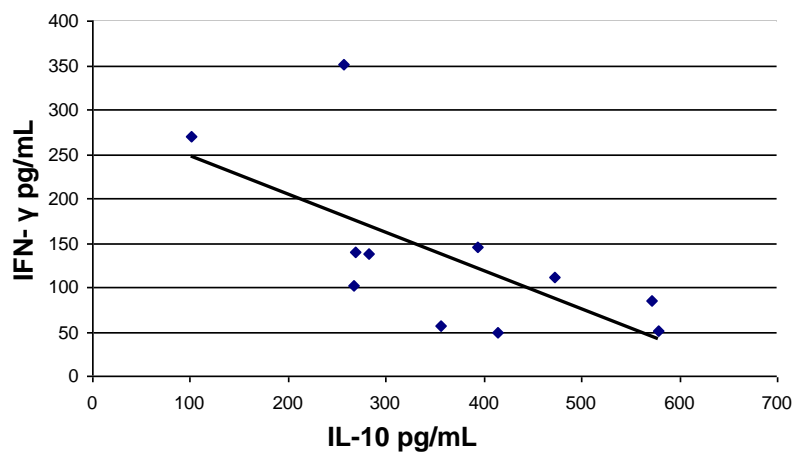


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: (FLOsg 125): células expostas ao FLOsg na concentração de 125 µg/mL. (FLOsg62,5): células expostas ao FLOsg na concentração de 62,5 µg/mL. (FLOsg31): células expostas ao FLOsg na concentração de 31 µg/mL. Cultura de sangue total no período de 24h.

A Figura 32 apresenta a correlação entre as dosagens de IFN- γ e dosagens de IL-10 de cada paciente diabético, em culturas de sangue total, não expostas a FLOsg. A análise da correlação de Pearson foi aplicada e apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), o que indica que a produção do IFN- γ é inversamente proporcional à de IL-10 nos pacientes diabéticos do estudo.

Figura 32 - Correlação entre dosagens de IFN- γ e IL-10 em culturas de sangue total não expostas a FLOsg dos pacientes diabéticos.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Dados oriundos de um total de 12 pacientes. R^2 - 0,4344 e diferença estatística de $p < 0,05$.

O DMSO a 0,5%, utilizado para diluição do FLOsg em salina, não influenciou em alterações nas dosagens das citocinas avaliadas (dados não mostrados).

6. Discussão

6 DISCUSSÃO

De acordo com a composição centesimal das sementes da graviola, ela tem potencial para utilização na dieta humana e animal. O alto conteúdo lipídico, maior que 18% (Tabela 1), favorece o aproveitamento das sementes para a produção de óleos com finalidade alimentar, farmacêutica ou industrial. Um alto percentual de umidade das sementes foi identificado em aproximadamente 35%. Dessa forma, a extração de componentes lipídicos pode ser facilitada por meio de processos de secagem das sementes, tais como a liofilização.

Frasakin e colaboradores (2008) também avaliaram a composição das sementes da graviola da Nigéria e identificaram um elevado teor de lipídios e proteínas, além de baixo teor de substâncias tóxicas (taninos, fitatos e cianetos). Os autores identificaram uma porcentual de 22,57% de lipídios na semente e um total de 27,34% de proteína, quantidades maiores do que as amostras do presente estudo. Essas variações podem ser relacionadas com as condições climáticas e do solo onde as sementes são cultivadas (MARINELI et al., 2014).

As sementes da graviola deste estudo apresentaram um percentual maior de compostos fenólicos (3,1-3,2 mg/g ou 310-320mg%) do que quatro variedades da *Annona* de madeira (*Annona cherimola* Mill.), de origem portuguesa, identificadas com valores inferiores a 0,05 mg/g de amostra das sementes (SANTOS et al. 2014). Efraim e colaboradores (2006) identificaram sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.) com alto teor de compostos fenólicos, cujos valores foram de 61 a 215,5mg/g extrato seco. Rocha e colaboradores (2011) avaliaram os compostos fenólicos em frutas do cerrado brasileiro e observaram valores para ácido gálico e tânico equivalentes de 90-405mg%. Pinto e colaboradores. (2012) avaliaram o conteúdo de fenólicos em sementes da *Carpotroche brasiliensis*, oriundas da mesma região onde foram coletadas as amostras da graviola deste estudo, e identificaram níveis de fenóis entre 4.0-5,9mg/g de extrato. Desta forma, a semente da graviola pode ser considerada fonte moderada de compostos fenólicos.

Extratos das sementes apresentaram melhor capacidade antioxidante do que o óleo, ou seja, mais baixo valor da IC₅₀ do DPPH e mais alto valor em equivalentes para o ABTS e FRAP (Tabela 2). O ácido gálico é um padrão utilizado com elevada capacidade antioxidante (ROESLER et al., 2007). Algumas amostras de frutas

apresentam capacidade próxima a este padrão, por exemplo, o extrato hidroalcoólico da acerola, com uma IC₅₀ do DPPH, no valor de 1,74 µg/mL (ROESLER et al., 2007). Em comparação com os valores obtidos do ácido gálico nos três métodos avaliados de atividade antioxidante *in vitro*, as sementes da graviola e a FLOsg têm baixa atividade antioxidante.

Óleos vegetais, mesmo submetidos a processos de refinamento, têm um teor considerável de tocoferóis, principais antioxidantes encontrados em óleos (GUINAZI et al., 2009). Provavelmente, a FLOsg pode, naturalmente, apresentar baixo conteúdo desses antioxidantes ou tais compostos podem ter sido perdidos durante as etapas de extração do óleo, por exemplo, por reações de oxidação.

Existem relatos de que frações lipofílicas das plantas contêm menos do que 10% da capacidade antioxidante em comparação com as frações hidrofílicas (WU et al., 2004). No presente estudo, apenas no método FRAP o valor de sementes e do óleo de semente foram semelhantes. Nos ensaios do DPPH e ABTS, a fração lipídica, ou seja, o OSG apresentou menor capacidade antioxidante, o que confirma, em parte, o relato da literatura (WU et al., 2004). Normalmente, o conteúdo de compostos fenólicos de uma amostra é diretamente proporcional à sua ação antioxidante (RICE-EVANS; MILLER, 1996). Como as amostras das sementes foram caracterizadas com teor moderado de compostos fenólicos, seria esperado que não apresentasse uma importante ação antioxidante.

Apesar da baixa atividade antioxidante identificada nas sementes e no FLOsg, os extratos das folhas de *A. muricata* são bem caracterizados na literatura com propriedades antioxidantes (ADEWOLE; OJEWOLE, 2009; LEE et al., 2014). Lee E colaboradores (2014) avaliaram a atividade dos componentes antioxidantes em extratos secos das folhas da *A. muricata*. O valor IC₅₀ do DPPH foi de 98,9±9,1 mg/mg extrato e o conteúdo total dos compostos fenólicos foi de 86,5±14,8 mg GAE/g extrato. Neste estudo, o extrato da folha da *A. muricata* foi identificado como uma rica fonte de antioxidantes, por ser fonte de carotenoides, sendo classificado como ingrediente funcional.

De acordo com o perfil dos ácidos graxos do presente estudo, os três principais ácidos graxos identificados foram o ácido oleico (ômega-9), linoleico (ômega 6) e palmítico (Tabela 3). Estes dados corroboraram os achados na

literatura, em que Castro e colaboradores (1984) identificaram estes ácidos graxos presentes na semente da graviola e em porcentuais semelhantes.

A FLOsg apresentou porcentual de ácidos graxos monoinsaturados semelhante ao óleo de palma (ou azeite de dendê) (40,1%) e superior em poli-insaturados do que o óleo de palma (16,6%), óleo de babaçu (30,2%) e canola (28,4%) (NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, 2006).

Os ácidos graxos oleico e linoleico, os mais representativos da FLOsg, respectivamente em porcentuais de 39,2% e 32,99% (Tabela 3), estão bem caracterizados e implicam benefícios para a saúde cardiovascular e redução do risco de síndrome metabólica (MAYNERIS-PERXACHS et al., 2014).

Alguns estudos sugerem que, em adição aos benefícios dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais, a presença de componentes minoritários como alcaloides, fitosteróis e polifenóis carregados da fonte natural ou matéria-prima do óleo, atuam sinergicamente, favorecendo as propriedades funcionais inerentes, como por exemplo, no óleo de coco (VYSAKH et al., 2014), no óleo de primola (MONTERRAT-DE LA PAZ et al., 2012; MONTERRAT-DE LA PAZ et al., 2014) e no óleo de chia do Chile (MARINELI et al., 2014). Além de alguns alcaloides identificados na *A. muricata*, tais como anonina, muricina e muricinina (FRAZÃO; MELO, 2007), outros compostos como as acetogeninas também são encontrados especificamente na família *Annonaceae* e apresentam atividade antitumoral e indutora de apoptose (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Os resultados apresentados, de acordo com a reação positiva para acetogenina, por cromatografia em camada fina e a análise do peso molecular por HPLC-DAD, mostram que o óleo bruto extraído das sementes da graviola contém acetogenina, sendo a anonacina o composto principal (Figuras 11, 12 e 13). Champy e colaboradores (2004) analisaram extratos de polpas de frutas, néctar, infusões e decocções de folhas da *A. muricata* e identificaram que a anonacina representou cerca de 70% das acetogeninas quantificadas.

A presença da anonacina nas amostras do óleo bruto da semente da graviola foi maior no PtOsg (mais ainda na fração metanólica) do que na FLOsg. Desta forma, o processo de separação física do óleo bruto, por centrifugação, permitiu uma redução no teor de acetogeninas, em especial da anonacina.

Uma fração de acetato de etila obtida do extrato de folhas da *A. muricata* foi avaliada em cromatografia, em camada delgada analítica, quando os resultados do peso molecular indicaram presença da anonacina, representando 82,5% do total da fração. Esta fração, na concentração de 25 µg/mL apresentou importante eficácia na inibição do crescimento celular de linhagens tumorais (>80%) (BARRETO, 2014). Nesse mesmo estudo, a anonacina foi isolada para avaliação da citotoxicidade, apresentando esse efeito em todas as linhagens tumorais testadas, especialmente nas HCT-116, OVCAR-8, PC-3M, SF-295. Foi observado que a anonacina não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas (até 8,38µM) em células mononucleares de sangue periférico e, portanto, tem ação citotóxica seletiva à células tumorais (BARRETO, 2014).

A anonacina é caracterizada por suas propriedades neurotóxicas e inibidora do complexo I mitocondrial (CHAMPY et al., 2004; LUNA et al., 2006; ESCOBAR-KHONDIKER et al., 2007; HÖLLERHAGE et al., 2015), sendo um importante indutor de apoptose em células cancerígenas (YUAN et al., 2003; KO et al., 2011; BARRETO, 2014). Apesar dessa atividade antitumoral, as acetogeninas podem estar relacionadas com a etiologia de doenças neurodegenerativas, tais como o parkinsonismo guadalupiano e perturbações atípicas na proteína tau (proteínas que estabilizam microtúbulos no Sistema Nervoso Central) devido à depleção de ATP e a interrupção do transporte mitocondrial em células neurais (CHAMPY et al., 2004). A hipótese do parkinsonismo guadalupiano (PG) foi confirmada por um estudo de caso controle que comparou pacientes com PG idiopática e mostrou que eles consumiam, de forma significativa, mais frutas e infusão ou decocção de folhas de plantas da família *Annonaceae*, particularmente *Annona muricata* (CAPARROS-LEFEBVRE; ELBAZ, 1999).

Mais de 500 acetogeninas já foram isoladas em várias espécies de plantas da família *Annonaceae*, incluindo a *A. muricata* (LIAW et al., 2010; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). As acetogeninas foram identificadas nos extratos das folhas, caules, sementes e nenhum relato, até o momento, no óleo extraído das sementes. Uma fruta média pode conter 15 mg de anonacina, o néctar (330ml), cerca de 36 mg e uma xícara de infusão ou decocção das folhas, cerca de 140 µg. Especula-se que um adulto que consuma diariamente a fruta ou néctar da graviola por um ano, ingira quantidade suficiente de anonacina, equivalente à dose que induziu lesões cerebrais

em ratos por infusão intravenosa. Desta forma, o consumo excessivo de produtos que contenham acetogeninas, em especial a anonacina, deve ser considerado para evitar neurotoxicidade (CHAMPY et al., 2005).

Os mecanismos farmacocinéticos da anonacina ainda estão a ser conhecidos. Bonneau e colaboradores (2015) desenvolveram um método para a quantificação da anonacina em plasma de rato, utilizando o seu análogo annonacinone como um padrão interno e identificaram um eficaz processo de extração no plasma, limites de detecção e biodisponibilidade.

Nos ensaios de viabilidade celular *in vitro* em esplenócitos, os dois métodos utilizados, MTT-Tetrazólio e Resazurina sódica, identificaram citotoxicidade da FLOsg nas concentrações de 250-4000µg/mL (Figura 14). Apenas o ensaio da resazurina sódica identificou a concentração de 125µg/mL como citotóxica. Como houve diferença entre os dois métodos, essa concentração também foi testada nos ensaios de cultura celular *in vitro* para dosagem de citocinas, juntamente com as duas maiores concentrações não tóxicas (62,5 e 31µg/mL).

A avaliação da citotoxicidade de células de sangue é principalmente realizada em culturas de células mononucleares de sangue periférico (ORTA-GARCÍA et al., 2015; DICSON et al., 2015) ou em testes de atividade hemolítica de eritrócitos (ISRAEL et al., 2015; SIVAPRIYA; GOWDA; SRINIVAS, 2015). Não foram encontrados estudos de citotoxicidade em células de sangue periférico para reprodução da metodologia. Sendo assim, a viabilidade celular dessas células *in vitro* foi testada no ensaio da resazurina sódica, já que o indicador de oxirredução se encontra no sobrenadante celular (RAMPERSAD, 2012). A cultura celular de sangue periférico é escura, o que impossibilita leitura no espectrofotômetro de reações colorimétricas exclusivas das células, como no caso do MTT-Tetrazólio. A mudança de estado oxidado (resazurina) ao reduzido (resofurina) no ensaio da resazurina sódica permite flexibilidade de detecção onde as medições podem ser quantitativas (colorimétrica e/ou fluorométricas) ou qualitativas, como uma mudança visível na cor, indicando a presença ou ausência de células viáveis (RAMPERSAD, 2012). Dessa forma, a avaliação da citotoxicidade em células de sangue total foi realizada de forma qualitativa, quando foi visivelmente perceptível a diferença da coloração do indicador oxirredução, ou seja, menor presença da redução da resazurina (cor azul) em resofurina (cor rosa), em doses superiores a 125 µg/mL (Figura 9). Dessa forma,

foram consideradas doses seguras, para os ensaios *in vitro* de cultura de sangue periférico humano, concentrações da FLOsg igual ou inferiores a 125 µg/mL.

Na literatura, não foram encontrados dados sobre a citotoxicidade do óleo extraído das sementes da graviola. Frações de acetato de etila e metanólica, obtidas por extratos de folha da *Annona muricata*, apresentam citotoxicidade em concentrações mais baixas do que a FLOsg, sendo 25 µg/mL bastante efetiva na inibição celular frente a linhagens tumorais (BARRETO, 2014).

Para avaliação da toxicidade de doses repetitivas do OsgB e FLOsg, *in vivo*, dois protocolos foram realizados, administrando as mesmas doses; e elas diferiram apenas na adição do processo de filtração para obter a emulsão do FLOsg em salina. Na curva de sobrevivência dos animais (Figura 15), não houve diferença estatística entre a mortalidade nos grupos experimentais. No entanto, a taxa de redução da sobrevivência, em mais de 50% no grupo *OsgB1,0* foi bastante elevada e implica consideráveis efeitos tóxicos do óleo bruto. Todos os animais que receberam o óleo filtrado (FLOsg) permaneceram vivos durante todo o experimento, o que sugere que a mortalidade identificada no grupo *OsgB1,0* foi relacionada ao consumo do precipitado presente no óleo, identificado visivelmente após a centrifugação e depletado após filtração.

Alguns parâmetros bioquímicos e físicos avaliados confirmaram o efeito tóxico do consumo do óleo, contendo o precipitado (OsgB) no grupo *OsgB1,0*, como a glicemia, a variação de peso negativa, além de sinais de toxicidade observados pela alteração da pelagem e alterações histopatológicas no tecido hepático e renal (Tabela 4 e Figuras 16 e 18). As acetogeninas, em especial a anonacina, já é caracterizada como neurotóxica (LANNUZEL et al., 2003; CHAMPY et al., 2004; HÖLLERHAGE et al., 2009; HÖLLERHAGE et al., 2015). De acordo com os resultados da avaliação toxicológica do presente estudo, *in vivo*, efeitos hepatotóxicos também podem ser considerados.

Nos animais que receberam a FLOsg, não foram observados sinais físicos de toxicidade, o que aponta, potencialmente, que algo no precipitado pode estar relacionado à toxicidade observada. No entanto, foi identificada uma redução do peso do fígado dos animais dos grupos FLOsg0,5 e FLOsg1,0 em relação ao grupo CtrlFLOsg (Tabela 4). Efeito hepatoprotetor já foi identificado no óleo de coco, no estudo de e colaboradores(2011). O tratamento com óleo de coco virgem diminuiu

a hepatotoxicidade induzida por paracetamol, por reduzir as dosagens das enzimas hepáticas e melhorar morfologia hepática. Outro parâmetro também observado no FLOsg1,0 foi uma redução dos níveis de creatinina frente ao CtrlFLOsg, porém sem significância estatística. Efeitos hepatoprotetores e de metabolização renal podem ser explorados em outros estudos *in vivo* do potencial farmacológico da FLOsg, com este enfoque.

Na avaliação do potencial farmacológico da FLOsg, no protocolo experimental de DM tipo 1, foi observado que o tratamento de animais diabéticos com o óleo conseguiu reverter e/ou evitar o dano/estresse oxidativo proveniente da administração da STZ. A STZ promoveu hiperglicemia (Figura 20), diminuição da insulina sérica (Figura 21) e da área das ilhotas pancreáticas (Figura 22), com atrofia característica, além de lesão hepática de acordo com as análises histopatológicas (Figuras 23 a 25) e aumento da ALT (Tabela 5). O tratamento com a FLOsg no grupo Stz-FLOsg promoveu efeito anti-hiperglicêmico (Figura 20), preservação da área das ilhotas pancreáticas e, conseqüentemente, diminuição da morte das células β (Figura 22), além de preservação do tecido hepático e recuperação parcial do glicogênio (Figuras 23 a 25).

Efeitos hepatoprotetores, em especial em relação ao estresse oxidativo no fígado, são relevantes para o controle do diabetes, visto que esse órgão desempenha um papel importante na manutenção da homeostase da glicose por mediação de sinais metabólicos de absorção, estoque e catabolismo de glicídicos (FERRE et al.,1996).

Gulle e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos da administração intraperitoneal do dexpantenol (agente anti-inflamatório e antioxidante), em ratos diabéticos, induzido por STZ, durante seis semanas. Os resultados apontam que o tratamento diminuiu danos oxidativos no fígado e no pâncreas, promoveu recuperação do glicogênio hepático, diminuição da perda de células β por preservar o tamanho das ilhotas e diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias no soro (IL-1 α e MCP-1). No entanto, dados sobre glicemia e insulina sérica não foram apresentados.

A preservação da área das ilhotas é importante uma vez que suspende ou diminui a progressão da perda das células β . A limitação dessa perda celular pode

resultar em funcionalidade das células residuais e isto beneficia o paciente diabético do ponto de vista clínico (IN'T VELD, 2014).

A avaliação da insulina sérica e parâmetros físicos, como aparência geral e peso dos animais, apresentaram resultados negativos em relação ao tratamento da FLOsg no grupo Stz-FLOsg. O menor nível de insulina identificado no grupo Stz-FLOsg pode estar relacionado, proporcionalmente, à média do peso dos animais, que foi menor em comparação à média dos demais grupos experimentais.

O tratamento com a FLOsg promoveu proteção e/ou regeneração das células das ilhotas, porém, pode não ter sido suficiente para manter a funcionalidade dessas células e, por conseguinte, para a produção da insulina, provavelmente devido à magnitude do estresse oxidativo da STZ.

Desta forma, em razão da baixa dosagem de insulina sérica detectada, efeitos extrapancreáticos da FLOsg podem ter contribuído com sua ação anti-hiperglicêmica, tais como a melhor captação de glicogênio hepático, como foi visualizado pelas análise histológica hepática (Figura 25), além de outros efeitos não testados, como melhoria da ação de enzimas que atuam nos processos da glicogênese ou na via glicolítica, permitindo assim captar a glicose e melhorar os níveis séricos a limites próximos dos animais controles. Muitas plantas apresentam mecanismos de reduzir a glicemia por fatores como: atuação sobre as células β do pâncreas, por estímulo para produção/liberação de insulina, e estimulação do efeito da insulina ou adrenalina (GRAY; FLATT, 1997; GRAY; FLATT, 1998); melhor sensibilidade ao receptor da insulina (LI et al., 2004); diminuição da degradação do glicogênio por inibição de enzimas que atuem na glicogenólise hepática (HUO et al., 2003); aumento do consumo periférico da glicose (GRAY; FLATT, 1997; HUO et al., 2003); resistência a peroxidação lipídica e maior eliminação de radicais livres (JIN et al., 2004).

Em modelo experimental de diabetes induzido por STZ, Swanston-Flatt e colaboradores (1990) identificaram efeitos hipoglicemiantes de extratos da agrimônia (*Agrimonia eupatoria*), coentro (*Coriandrum sativum*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) e zimbro (*Juniperus communis*); e também observaram que o tratamento com os extratos não melhorou as concentrações plasmáticas de insulina, em relação aos animais diabéticos não tratados. Os autores sugerem que existam outros efeitos para redução da glicemia e não apenas a melhora da produção da insulina. Em

outro estudo de Gray e Flatt (1997), o extrato aquoso da alfafa (*Medicago sativa*) foi adicionado à ração de camundongos diabéticos induzidos por STZ, promoveu estímulo da oxidação da glicose e da glicogênese e estimulou gradualmente a secreção da insulina. Os autores discutem que o efeito na melhora da glicemia nos animais diabéticos se deve não exclusivamente ao aumento da secreção da insulina, pois a redução da glicemia foi observada mesmo quando a dosagem da insulina ainda estava baixa, indicando ação metabólica anti-hiperglicêmica do extrato avaliado.

Os ácidos graxos oleico (ω -9) e linoleico (ω -6), principais identificados no óleo, já foram descritos com propriedades antidiabéticas e/ou anti-inflamatórias. (MORGAN et al., 2008; VASSILIOU et al., 2009; MORGAN, 2009; JENG et al., 2009).

Ácidos graxos essenciais linoleico (ω -6) e linolênico (ω -3) podem prevenir o diabetes induzido por aloxano, reforçar capacidade antioxidante e suprimir a produção de citocinas (KRISHNA MOHAN; DAS, 2001). Os ácidos graxos essenciais apresentam efeito protetor contra citotoxicidade do pâncreas proveniente da STZ e melhora dos níveis de glicemia e insulina sérica (CANETTI et al., 2014). Células β de ratos (RIN-m5F) foram expostas a STZ e tratadas ou não com 4 μ M de ácido linoleico ou oleico. Mesmo expostas aos ácidos graxos, as células apresentaram baixa produção de insulina, no entanto, o ácido linoleico melhorou viabilidade celular após a exposição ao STZ, por manutenção da estrutura mitocondrial e aumento da biogênese mitocondrial (JENG et al., 2009).

Em outro estudo com células β de ratos (INS-1), sensíveis à glicose, a exposição das células ao ácido oleico a 10 μ M e 5 μ M, aumentou de forma significativa a produção da insulina. Quando esse sistema *in vitro* foi também exposto ao TNF, o ácido oleico reduziu o efeito inibitório dessa citocina sob a produção da insulina (VASSILIOU et al., 2009).

O tratamento com azeite de oliva ou com o óleo da *Nigella sativa*, em modelo experimental de DM1, melhorou complicações diabéticas e níveis de enzimas catalase e arilsulfatases, não sendo observados esses efeitos com o tratamento com óleo de canola (SALMARJI; BALBAA, 2014).

Estudo *in vivo*, com camundongos diabéticos, induzido por STZ (DM1) e induzido pela dieta (DM2), avaliou o efeito da administração oral do óleo de

amendoim, rico em ácido oleico (0,7ml/dia por 21 dias). Os resultados indicaram que o tratamento com o óleo reduziu a glicemia apenas dos animais DM2 e não apresentou efeito algum sobre a glicemia dos animais DM1 (VASSILIOU et al., 2009). Neste estudo, o óleo só foi administrado após a confirmação do diabetes, não havendo pré-tratamento. Desta forma, pode ser considerável um maior efeito protetor do ácido graxo frente aos danos oxidativos da STZ, do que propriamente um efeito regenerador, já que no presente estudo foi realizado um pré-tratamento com o óleo e identificada uma diminuição do dano hepático.

Nos estudos *in vivo* com animais diabéticos tratados com gel da folha da *Aloe vera* (CAN et al., 2004) e extrato de rooibos (*Aspalathus linearis*) (ULICNÁ et al., 2006) também foram observados efeitos hepatoprotetores dos extratos, semelhante aos do presente estudo em relação à manutenção da estrutura hepática.

Algumas plantas podem apresentar efeitos tóxicos, tais como hepatotoxicidade que resultam em hipoglicemia. Os animais diabéticos e tratados com a FLOsg (Stz-FLOsg) não apresentaram hipoglicemia, visto que a dosagem da glicemia foi semelhante àquela dos animais controles (Figura 20); também não apresentaram hepatotoxicidade pelas avaliações histológicas (Figuras 23 a 25), pelo contrário, apresentaram efeito protetor/regenerador dos danos oxidativos da STZ no fígado. Desta forma, é muito provável que o efeito anti-hiperglicêmico seja proveniente de ações metabólicas extrapancreáticas (MARLES; FARNSWORTH, 1995; LI et al., 2004), como melhor recuperação do glicogênio hepático.

Em relação aos parâmetros físicos, é perceptível que existe uma potencial interação farmacológica entre a FLOsg e a STZ, a qual promoveu algum efeito tóxico, porém não proveniente de toxicidade hepática e de toxicidade diabética. É possível que a presença da anonacina no óleo, ainda que encontrada em menor quantidade na FLOsg (mesmo usando a fração líquida e filtrada), pode ter efeitos neurotóxicos e/ou hepatotóxicos e/ou metabólicos/nutricionais, potencializados ou sinérgicos com a ação da STZ, e repercutidos nos sinais visíveis patológicos, como alteração da pelagem e caquexia. Em análises preliminares, não foram encontrados alcaloides no óleo da semente graviola, tanto no PtOsg, como na FLOsg (dados não mostrados). Porém, outros constituintes não identificados, especialmente de

natureza apolar, também podem estar presentes e podem ter contribuído para essa interação farmacológica.

Uma hipótese para a provável interação, que pode ser elucidada no futuro, é de que as acetogeninas, em especial a anonacina, age como inibidor do complexo I mitocondrial e está implicada em perturbações neurológicas, provenientes da diminuição do ATP, disponível para células neurais (LUNA et al., 2006; ESCOBAR-KHONDIKER et al., 2007; CHAMPY et al., 2004). Além dessas ações, a indução do diabetes pela STZ também tem sido implicada em disfunção mitocondrial e diminuição grave da atividade do complexo I mitocondrial (TAURINO et al., 2012; ORTIZ et al., 2013; CARDOSO et al., 2013; ORTIZ-AVILA et al., 2015).

A cadeia respiratória mitocondrial pode ser separada em quatro complexos enzimáticos, sendo o complexo I representado pelo NADH-Ubiquinona Redutase. Esta enzima desempenha um papel crucial na geração de ATP e seu papel no desempenho de doenças neurodegenerativas tem sido considerado (HÖLLERHAGE et al., 2009; SCHAPIRA, 2010).

A anonacina, pela sua natureza também lipofílica, atravessa facilmente as membranas biológicas, tais como a barreira hematoencefálica e a membrana dos neurônios e, portanto, tem acesso facilitado até a mitocôndria cerebral após exposição sistêmica (LANNUZEL et al., 2003; CHAMPY et al., 2004; HÖLLERHAGE et al., 2009). Höllerhage e colaboradores (2009) sugerem que pela característica também lipossolúvel da anonacina, ela tem acesso facilitado para o local de ligação no complexo I mitocondrial.

Um estudo *in vitro* com células de neurônios mesencefálicos humanos avaliou o efeito de extratos vegetais da família Annonaceae na viabilidade dessas células. Os resultados indicaram importante efeito neurotóxico dos extratos avaliados. O extrato da polpa da *A. muricata* apresentou maior efeito neurotóxico, com 67% de morte celular a uma concentração de 1 µg/mL. Uma elevada redução da viabilidade celular também foi observada pelo extrato das sementes das anonáceas a 0,1 µg/mL (HÖLLERHAGE et al. 2015).

Modelos experimentais de diabetes induzido por STZ demonstram disfunção mitocondrial no cérebro (ORTIZ et al., 2013; CARDOSO et al., 2013) e esta disfunção pode estar relacionada à neuropatia do diabetes (MASTROCOLA et al., 2005; KAMBOJ; SANDHIR, 2011). ORTIZ-AVILA e colaboradores (2015) avaliaram

o efeito do óleo de abacate na função mitocondrial e estresse oxidativo no cérebro de ratos, com diabetes induzido por STZ. Neste estudo, foi observado um prejuízo no potencial de membrana mitocondrial e uma diminuição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias de ratos diabéticos.

Uma análise proteômica, em combinação com quantificação de mRNA e atividade do ensaio do complexo I mitocondrial (EC 1.6.5.3 NADH:ubiquinone reductase) do cérebro de ratos diabéticos induzidos por STZ, identificou uma diminuição do nível de proteína da subunidade Ndufs3, decremento do seu mRNA e uma depressão grave da atividade enzimática do complexo I. Neste estudo, foi observada, na fase inicial da doença, uma redução de 80% do nível da subunidade Ndufs3, associada com depressões igualmente graves na atividade enzimática do complexo I, em comparação com ratos controles. Estes fatores são críticos para o desenvolvimento de encefalopatia (TAURINO et al., 2012).

Além dessas implicações, a STZ também contribui com efeitos oxidativos hepáticos e foram observados efeitos hepatotóxicos do PtOsg no protocolo toxicológico *in vivo*. Este efeito potencializado também pode ser considerado de forma conjunta com STZ e FLOsg.

A ação sinérgica da FLOsg com a STZ é clara quando se observa os resultados do grupo que apenas recebeu a FLOsg (grupo FLOsg). Os animais do grupo FLOsg não apresentaram alteração da glicemia (Figura 20), alterações físicas (Tabela 5 e Figura 26-D), bioquímicas (Tabela 5) e de lesão hepática (Figuras 24 a 26). Novos estudos serão conduzidos em modelo experimental com camundongos NOD para avaliar o efeito da FLOsg em diabetes melito autoimune, sem a possível interferência da STZ.

Foi observado que a administração da FLOsg (sem indução da diabetes) promoveu um aumento da insulina sérica (Figura 21) e afetou o estoque de glicogênio (Figura 25).

A ação insulínica da FLOsg pode ser relacionada à composição de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) identificada. AGCL pode estimular a secreção da insulina por ativar o receptor acoplado à proteína G (GPR-40), o qual é expresso abundantemente no pâncreas. O ácido linoleico tende a normalizar a composição dos fosfolípidios da membrana celular e mantém o funcionamento do

receptor GRP40, o que contribui para aumentar os níveis de insulina (ITOH et al., 2003; ITOH; HINUMA, 2005).

Como não foram observadas outras alterações histopatológicas hepáticas nos animais do grupo *FLOsg*, o fator que levou à diminuição no estoque do glicogênio não foi completamente elucidado no presente trabalho. Algumas hipóteses podem ser citadas: 1) maior utilização da glicose sanguínea, de acordo com a maior disponibilidade de insulina (ação insulínica da *FLOsg*, e conseqüentemente, maior recrutamento do glicogênio (glicogenólise); 2) maior utilização periférica da glicose, especialmente em músculos, devido a possíveis efeitos extrapancreáticos da *FLOsg* no controle da glicemia, quando resultaria a promoção da glicogenólise. Estes mecanismos podem ser explorados em outros estudos focados nos mecanismos metabólicos afetados pelo tratamento com o óleo.

As células do baço dos animais do grupo Stz foram cultivadas na presença e ausência da *FLOsg*. O baço é um órgão linfóide secundário e um dos órgãos que mais recebe influência de espécies reativas de oxigênio (ROS), após indução do DM por STZ, em modelo animal (AL GHAMDI et al., 2015). Citocinas pró-inflamatórias são induzidas por espécies reativas de oxigênio (ROS), através de vias de sinalização redox-dependente (LINDSEY et al., 2013).

Nas dosagens das citocinas IL-4, IL-17 e IL-10, na cultura de esplenócitos *in vitro*, não houve diferença entre os grupos de células dos animais Ctrl e Stz (Figura 28). Porém, quando as células dos animais Stz foram expostas a *FLOsg* na concentração de 125µg/mL, foi observado aumento significativo das citocinas IL-4 e IL-10. As concentrações citotóxicas de 1000, 500 e 250µg/mL também foram testadas neste ensaio e apresentaram redução nos níveis das citocinas analisadas, exceto na concentração de 1000 µg/mL que aumentou níveis de IL-10, provavelmente por mecanismos citotóxicos e de defesa das células (dados não apresentados).

A modulação da resposta tipo Th1, característica do DM1, e o desvio imunológico para Th2 são importantes para diminuição do desequilíbrio inflamatório do DM1 (CAO et al., 2015), especialmente via supressão das células Th1 ativadas (SHI-FENG et al., 2015).

Um estudo *in vivo* com camundongos NOD *knockout* em IL-4 e IL-10 avaliou a proteção dessas citocinas contra o DM1 induzido por α -Galactosilceramida. Os autores apontaram o papel protetor da IL-4 contra o DM1 (MI et al., 2004).

Já foi demonstrado que a IL-17 induz a liberação de quimiocinas inflamatórias e, conseqüentemente, exacerba a autoimunidade (GRIECO et al., 2013; BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007). No entanto, existem controvérsias relacionadas ao seu papel na patogênese do DM1 (BELLEMORE et al., 2015). Neste trabalho, não foi encontrada diferença significativa na produção de IL-17 entre camundongos Stz e Ctrl, o que sugere que a IL-17 não está envolvida neste modelo experimental. Rahavi e colaboradores (2015) também não demonstraram diferenças na produção de IL-17 em cultura de esplenócitos, entre animais controles e induzidos de diabetes por STZ. No entanto, Tong e colaboradores (2015) avaliaram o impacto da deficiência da IL-17 em camundongos diabéticos induzidos pela STZ. Os autores observaram que os animais *knockout* em IL-17 apresentaram menos células T CD8+ e foi enfatizado o papel patogênico desta citocina no DM1.

A indução de regulação imunológica também tem um importante papel na imunopatologia do DM1 (BELLEMORE et al., 2015). A IL-10 inibe as células T CD8+ e a inflamação em várias doenças inflamatórias (ENDHARTI et al., 2005). Além disso, bloqueia as células Th17 patogênicas por inibir a diferenciação e proliferação destas células (BELLEMORE et al., 2015).

De acordo com os resultados das dosagens das citocinas em cultura de esplenócitos, o OSG na concentração de 125 μ g/mL induziu aumento da produção de IL-10 em cultura, apresentando, portanto, propriedade imunomoduladora *in vitro*. Hipotetiza-se que esta capacidade de indução de IL-10 possa, pelo menos em parte, ter algum papel na melhoria dos parâmetros inflamatórios avaliados no modelo experimental de DM1 induzido por STZ.

No estudo experimental conduzido por Malekifard e colaboradores (2015), utilizando animais diabéticos induzido por STZ, os níveis das citocinas IL-17, IL-10 e IFN- γ foram avaliados em cultura de esplenócitos tratados com Pentoxifilina (100 mg/kg/dia, i.p., por 21 dias), substância imunomoduladora e anti-inflamatória usada para o tratamento de desordens vasculares. Foi observado que o tratamento com a droga diminuiu os níveis de IL-17 e IFN- γ e aumentou os níveis de IL-10, sendo sugerido que a substância poderia ter potencial para o tratamento da DM1.

O tratamento com curcumina, também em modelo experimental de DM1, porém induzido por ciclofosfamida (CYP), também apresentou um papel imunomodulador na diferenciação dos linfócitos T naive, inibindo fortemente o perfil inflamatório Th1. A curcumina promoveu diminuição na proliferação de células T e secreção de IFN- γ , em cultura de esplenócitos dos animais tratados, além de inibir a expressão de T-bet, que tem papel central no desenvolvimento do perfil Th1 (CASTRO et al., 2014).

Em relação às dosagens de citocinas da cultura de células de sangue periférico dos pacientes com DM1 selecionados, foi observado que a intensidade da produção do IFN- γ é independente do período de diagnóstico/duração da doença, que variou entre sete meses até oito anos do DM diagnosticado (dados não apresentados). Karlsson-Faresjö, Ernerudh e Ludvigsson (2004) avaliaram níveis de citocinas até 90 dias após o diagnóstico do DM1 e observaram que os níveis de IFN- γ , em sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico, (PBMC) aumentam durante o primeiro mês após o diagnóstico. Foss-Freitas e colaboradores (2007) identificaram aumento dos níveis de IFN- γ em pacientes DM1, vários anos

após o diagnóstico em comparação com pacientes DM2. Os autores sugerem que as características imunológicas observadas nas fases iniciais do DM1 podem ainda persistir durante anos.

Alguns pacientes apresentaram um perfil mais responsivo do que outros e foram agrupados de acordo com este perfil para melhor avaliação do efeito da exposição a FLOsg. Em um total de 12 pacientes, 6 que apresentaram as maiores dosagens de IFN- γ foram agrupados como diabéticos altos produtores de IFN- γ .

O motivo das diferenças na produção de IFN- γ em pacientes diabéticos autoimunes ainda não está claro. Não houve correlação entre as dosagens de IFN- γ , das culturas de células de sangue total não expostas a FLOsg, dos pacientes diabéticos e seus valores de hemoglobina glicada (HbA1C) (dados não mostrados). Desta forma, não houve relação com controle metabólico apresentado individualmente pelos pacientes.

Foss-Freitas e colaboradores (2007) também observaram que pacientes DM1 apresentavam diferenças nas concentrações de IFN- γ . No entanto, as maiores dosagens de IFN- γ foram relacionadas ao controle metabólico apresentado pelos

pacientes. Os autores sugeriram um padrão de resposta inflamatória em pacientes com bom controle metabólico. Ainda, no mesmo estudo, muitos pacientes DM1 apresentaram níveis de IFN- γ equivalentes aos dos pacientes controles, o que pode confirmar um perfil responsivo observado.

A exposição das células a FLOsg reduziu a produção do IFN- γ no grupo mais responsivo, nas concentrações de 125 e 31 μ g/mL, no período de 24h, e 62,5 e 31 μ g/mL, no período de 72h (Figura 30). Embora tenha havido uma diferença estatística entre a exposição às diferentes concentrações testadas, a produção do IFN- γ foi reduzida de forma muito semelhante entre estas, o que comprova o potencial da FLOsg em reduzir esta citocina impactante para a progressão do diabetes.

O IFN- γ tem um papel importante na patogênese e exacerbação de autoimunidade (THOMAS et al., 2009). IFN- γ , juntamente com a IL-1, é uma combinação mínima necessária para estimular a expressão do óxido nítrico sintase (iNOS) e a produção de níveis micromolares de óxido nítrico nas ilhotas pancreáticas, em linhagens celulares humanas e de animais (CORBETTT; MC DANIEL, 1995; CORBETTT et al., 1993). O óxido nítrico inibe os canais de potássio

ATP-sensíveis, evita a despolarização celular, o influxo de cálcio e, conseqüentemente, a exocitose da insulina (PADGETT et al., 2013). A diminuição do IFN- γ é importante visto que não potencializa a ação da IL-1 e, desta forma, reduz a ação inibitória do óxido nítrico na secreção da insulina.

As dosagens da IL-10 na cultura de sangue total foram avaliadas apenas no período de 24h, já que a produção desta citocina foi padronizada e caracterizada na literatura neste período de incubação (ALCÂNTARA-NEVES et al., 2014). Semelhante à produção do IFN- γ , não houve diferença entre as dosagens da IL-10 de acordo com o tempo de duração do DM diagnosticado (dados não mostrados) e, desta forma, para avaliação do efeito da FLOsg sobre a produção da IL-10, todos os pacientes foram agrupados como grupo diabético (DM). Foi observado que os pacientes diabéticos apresentam um nível mais baixo de IL-10 em comparação ao grupo controle (SDM) (Figura 31). A exposição das células a FLOsg não alterou os níveis desta citocina.

No presente estudo, foi identificada uma correlação entre as dosagens de IFN- γ e dosagens de IL-10 dos pacientes diabéticos (Figura 32, $p < 0,05$). Os valores das dosagens das citocinas, em culturas de sangue total não expostas a FLOsg, foram inversamente proporcionais, o que sugere um melhor padrão de regulação imunológica em pacientes que apresentam menor responsividade ao IFN- γ .

Al Ghamdi e colaboradores (2015) avaliaram os níveis de citocinas (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10 e TNF) no plasma de camundongos diabéticos induzidos por STZ, tratados com 100 mg/kg de peso do extrato etanólico do própolis, durante 30 dias. O tratamento dos animais diabéticos teve início duas semanas após a indução pela STZ. Os autores observaram que o tratamento reduziu os níveis de citocinas inflamatórias, porém, também não apresentou alteração nos níveis da IL-10.

O efeito da FLOsg na redução dos níveis de IFN- γ pode ser atribuído à presença de ácidos graxos insaturados no óleo, os quais podem alterar a composição de fosfolipídios de membrana, além de fatores de transcrição nuclear vinculados. Mecanismos que alteram a fluidez da membrana também modificam a ligação de citocinas aos seus receptores correspondentes (VASSILIOU et al., 2009).

Os efeitos benéficos dos ácidos graxos no organismo humano podem ser alcançados pelo consumo de óleos e gorduras de qualidade nutricional, seja por meio dos alimentos que compõem a dieta habitual ou por utilização de suplementos, como exemplo, cápsulas contendo doses adequadas de ácidos graxos (DÍAZ-LOPEZ et al., 2015; CARDOSO et al., 2015).

A intervenção nutricional pode contribuir para a prevenção de sinais de autoimunidade, especialmente voltada para a nutrição infantil em indivíduos com predisposição genética para o DM1 (NORRIS et al., 2007; KNIP; VIRTANEN; AKERBLUM, 2010; TRIGR, 2011), como também pode contribuir para diminuir complicações oriundas do mau controle metabólico do DM1 instalado (CADARIO et al., 2012; GINGRAS et al., 2015). No entanto, poucos estudos de intervenção na nutrição infantil foram realizados até o momento (KNIP SIMELL, 2012), bem como de efeitos da modulação na dieta no DM1 instalado.

Ainda há limitações para recomendação do consumo de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA), como ácido oleico, para prevenção do DM e outras doenças crônicas, devido à falta de estudos randomizados e controlados pr longo

tempo. No entanto, existem evidências de que o consumo de MUFA, dentro do contexto da Dieta do Mediterrâneo, associa-se à redução do risco de doenças crônico-degenerativas (SANTOS et al., 2013).

O padrão alimentar conhecido como a Dieta do Mediterrâneo, que se caracteriza pela diminuição do consumo de gorduras saturadas e aumento do consumo de ácidos graxos MUFA e PUFA, associado ao aumento de frutas, verduras, legumes, grãos e castanhas, foi avaliado em indivíduos adultos com DM1 e associado a um menor perfil de risco cardiometabólico, tais como menor índice de massa corporal, pressão sistólica, circunferência da cintura e taxa de disponibilidade de glicose estimada (GINGRAS et al., 2015). Alterações na dieta para este tipo de padrão alimentar também foi avaliado em crianças e adolescentes com DM1 e resultou em melhoria do perfil lipídico dos indivíduos (CADARIO et al., 2012).

O papel da dieta na incidência de complicações microvasculares no DM2 foi avaliado, durante um período de seis anos. A intervenção baseada na Dieta do Mediterrâneo e suplementação com azeite de oliva extra virgem contribuiu para a proteção contra a retinopatia diabética (DÍAZ-LOPEZ et al., 2015).

A ingestão de ácidos graxos e a intervenção dietoterápica já vêm sendo avaliadas frente à diminuição do risco para autoimunidade. A ingestão de ácidos graxos linolênico (ômega-3) por crianças com idade entre 1 e 6 anos foi avaliada e associada a um menor risco de autoimunidade em células β (NORRIS et al., 2007).

Em estudo piloto com 230 crianças finlandesas com suscetibilidade ao DM1 pela variação do HLA (antígeno leucocitário humano), a introdução mais tardia da proteína do leite de vaca foi avaliada nos primeiros meses de vida. Após seguimento do estudo até as crianças apresentarem uma média de 10 anos, foi observado que a intervenção nutricional resultou em uma diminuição na maioria dos sinais de autoimunidade das células β . Este estudo representa a primeira indicação de que modificação ambiental pode afetar a história natural pré-clínica do DM1 (KNIP; VIRTANEN; AKERBLOM, 2010).

Mejía-León e Calderón de La Barca (2015) discutem que a alteração da microbiota intestinal, acompanhada de intervenção dietética, parece ser a opção mais promissora para a prevenção do DM1 em crianças que apresentam riscos para a autoimunidade das células β .

Os dados da presente tese indicam que a intervenção na dieta pode promover efeitos que diminuem danos oxidativos, processos inflamatórios e risco de respostas imunológicas alteradas, como as respostas autoimunes. A nutrição pode ser modulada para haver uma menor exposição a antígenos/alérgenos alimentares e introdução diária de alimentos funcionais, com propriedades biológicas antioxidantes e/ou imunomoduladoras. Uma intervenção nutricional simples e segura, em especial nos pacientes com susceptibilidade genética para DM1 e, mais ainda, nos primeiros anos de vida, deve ser considerada como uma estratégia-chave para diminuir riscos de fatores adicionais necessários para desecandear a resposta e/ou modular processos autoimunes.

O tratamento com a FLOsg, neste estudo, demonstrou parâmetros positivos para o controle ou prevenção do diabetes melito tipo 1, embora tenha apresentado algum efeito tóxico, ainda não esclarecido, que requer investigações posteriores. Sendo assim, o conhecimento mais aprofundado por meio de estudos sobre os parâmetros tóxicos do óleo bruto da semente da graviola, observados em modelo experimental, além dos mecanismos moleculares que expliquem a ação antidiabética da FLOsg, são relevantes para posteriores estudos de intervenção clínica visando à ação terapêutica ou profilática do óleo.

7. Conclusões

7 CONCLUSÕES

A fração líquida do óleo da semente da graviola (FLOsg) apresentou qualidade nutricional com predominância dos ácidos graxos oleico (ω -9) e linoleico (ω -6). Apesar da baixa ação antioxidante *in vitro* identificada e do conteúdo moderado de compostos fenólicos, os ácidos graxos presentes apresentam importância nutritiva, sendo o linoleico um ácido graxo essencial.

O óleo bruto extraído da semente da graviola (OsgB) apresentou precipitados com propriedades tóxicas e foi facilmente separado da fração líquida por processo físico de centrifugação e filtração.

A presença de acetogeninas foi confirmada no óleo e frações e, em maior quantidade, no precipitado do óleo e na sua fração metanólica. A acetogenina mais predominante foi a anonacina. A propriedade tóxica do precipitado pode estar associada à presença desta acetogenina. A fração líquida do óleo não apresentou propriedades tóxicas *in vivo*.

Em modelo experimental de diabetes melito autoimune, o pré-tratamento e o tratamento com a FLOsg diminuiu efeitos tóxicos de disfunção hepática pela administração do STZ, apresentou propriedade anti-hiperglicêmica, melhorou parcialmente a recuperação do glicogênio, preservou a área das ilhotas pancreáticas e apresentou potencial imunomodulador *in vitro*, em modelo animal e humano. Acredita-se que esta ação antidiabética do óleo seja relacionada a efeitos extrapancreáticos.

A fração líquida do óleo da semente da graviola (FLOsg) apresenta potencial terapêutico para o tratamento e/ou prevenção da instalação clínica do diabetes melito tipo 1. A avaliação farmacológica de seus constituintes, com possíveis efeitos hepatoprotetores, e avaliação dos constituintes do precipitado do óleo (PtOsg), com possíveis efeitos neurodegenerativos/hepatotóxicos, podem ser mais bem explorados em outros modelos experimentais.

Referências

- 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. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 71, p. 325-330, 2000.
- ABDUL-RASOUL, M, HABIB, H.; AL-KHOULY, M. "The honeymoon phase" in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. **Pediatr Diabetes**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 101-107, 2006.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECURÁRIA DA BAHIA. **Produção de graviola no Brasil**. Salvador, 2011. Disponível em: <<http://www.adab.ba.gov.br/>. Acesso em: 1º set. 2015.
- ADEYEMI, D. A. et al. Anti hyperglycemic activities of *Annona muricata* (Linn). **Afr J Trad Complem Alter Med.**, Ile-Ife, v. 6, n. 1, p. 62-69, 2009.
- ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **Afr J Trad Complem Alter Med.**, Ile-Ife, v. 6, n.1, p. 30-41, 2009.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care.**, Alexandria, v. 38, s.1, p. 1-99, 2015.
- ATARASHI, K. et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. **Science (Wash.)**, Washington, v.21, p. 337-341, 2011.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet.**, London, v. 383, p. 69-82, 2014.
- ANTOUN, M. D. et al. Screening of the Flora of Puerto Rico for Potentialantimalarial Bioactives. **Int J Pharmacog.**, Celestijaanlaan, v. 31, n. 4, p.255-258, 1993.
- ASSUNÇÃO, M.C.F.; SANTOS, I.S.; COSTA, J.S.D. Avaliação do processo da atenção médica: adequação do tratamento de pacientes com *Diabetes mellitus*, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.205-211, 2002.
- AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECURÁRIA DA BAHIA. Disponível em:< <http://www.adab.ba.gov.br/>. Acesso em: 1 set. 2015
- AKBARZADEH, D. A. et al. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. **Indian J Clin Biochem.**, Durgapura, n. 22, v. 2, p. 60-64, 2007

ALCÂNTARA-NEVES, N. M. et al. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. **BMC Res Notes.**, London, v.19, n.7, p. 1-11, 2014

AL GHAMDI, A. A. et al. Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro inflammatory cytokine levels and oxidative stress. **BMC Immunol.**, London, v. 15/16, n.1, p. 1-14, 2015

ALMEIDA, E. J. et al. Propagação de três genótipos de abieiro (*Pouteria caimito*) por estaquia de ramos herbáceos. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 38, n. 1, p.1-4, 2008.

ANVISA- Agência Nacional de vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos.** Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília, 01 de março de 2010. 37p.

BAILEY, C.J.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care.**, Alexandria, v.12, n.8, p.553-564, 1989.

BARRETO, F. S. **Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. por fracionamento bioguiado.** 2014. 89 f. (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014

BELLEMORE, S. M. et al. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. **Clin Exp Immunol.**, London, v. 182, n. 3, p. 261-269, 2015

BETTELLI, E., KORN, T., KUCHROO, V.K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr Opin Immunol.**, Philadelphia, v.19, p. 652-657, 2007.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, Campinas, v. 12, n.2, p.123-130, 1999

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.**, Ottawa, v. 37, p. 911-917, 1959.

BÖNI-SCHNETZLER, M. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. **Endocrinology.**, Baltimore, v. 150, n. 12, p. 5218-5229, 2009.

BONNEAU, N. et al. Method development for quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, Amsterdam, v. 1, n. 1004, p. 46-52, 2015

BORIES, C. et al. Antiparasitic activity of annona muricata and annona cherimolia seeds. **Planta Med.**, New York, v. 57, n. 5, p. 434-436, 1991.

CADARIO, F. et al. Lipid profile and nutritional intake in children and adolescents with Type 1 diabetes improve after a structured dietician training to a Mediterranean-style diet. **J Endocrinol Invest.**, Milano, v. 35, n.2, p. 160-168, 2012

CAN, A. et al. Effect of *Aloe vera* leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat model. **Biol Pharm Bull.**, Tokyo, v.27, p. 694-698, 2004

CANETTI, L. et al. Linoleic and alpha linolenic acids ameliorate streptozotocin-induced diabetes in mice. **Arch Physiol Biochem.**, Lisse, v.120, n.1, p.34-39, 2014.

CAO, H. et al. TAK1 inhibition prevents the development of autoimmune diabetes in NOD mice. **Sci Rep Res Inst Tohoku Univ.[Med]**., Sendai v. 13, n. 5, p. 1-14, 2015

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **Lancet.**, London, v. 354, p.281-286, 1999

CARDOSO, D. A. et al. A coconut extra virgin oil-rich diet increases HDL cholesterol and decreases waist circumference and body mass in coronary artery disease patients. **Nutr Hosp.**, Madrid, v. 32, n. 5, p. 2144-2152, 2015

CASARES, S.; BRUMEANU, T.D. Insights into the pathogenesis of type 1 diabetes: a hint for novel immunospecific therapies. **Curr Mol Med.**, Omaha, v. 1, n.3, p. 357-378, 2001

CARBAJAL, D. et al. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in cuban folk medicine. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 33, n. 1/2, p. 21-24, 1991.

CARDOSO, S. et al. nsulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. **Neurobiol Dis.**, Orlando, v. 49, n.1, p. 1-12, 2013.

CASTRO, F. A. et al. Características físicas e químicas da graviola. **Pesq Agropec Bras.**, Brasília, v.19, n.3, p.361-365, 1984.

CASTRO, C. N. et al. Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol.**, London, v. 177, n.1, p.149-60, 2014

CERQUEIRA LIMA, A. T. et al. Effects of *Cissampelos sympodialis* Extract in a Murine Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. **Autoimm Dis Therap Approac.**, Campbell, v.1, n.2, 2014

CHAMPY, P. et al. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: Possible relevance for atypical parkinsonism in guadeloupe. **J Neurochem.**, Oxford, v.88, p. 63-69, 2004

CHAMPY, P. et al. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. **Mov Disord.**, New York, v. 20, p. 1629-1633, 2005

CHIARATTI, T. M. **8º Encontro de estudos avançados em plantas medicinais (2008)**. Disponível em: <

<http://www.reservaecocerradobrasil.org/pdf/Annona.pdf> > Acesso em: 20 fev. 2013

CORBETT, J.A.; MC DANIEL, M.L. Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. **J Exp Med.**, New York, v.181, p.559-568, 1995.

CORBETT, J.A. et al. Nitric oxide mediates cytokineinduced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Washignton, v.90, p. 1731-1735, 1993

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**, 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2007, 1002 p.

CNOP, M. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes.**, New York, n. 54, p. 97-107, 2005.

DANAEI G, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet.**, London, v.378, n. 9785, p. 31-40, 2011

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto alegre: Artmed, 2010, 900 p.

DEEDS, M.C. et al. Single Dose Streptozotocin Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models. **Lab Anim.**, London, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011

DÍAZ-LÓPEZ, A. et al. Mediterranean Diet, Retinopathy, Nephropathy, and Microvascular Diabetes Complications: A Post Hoc Analysis of a Randomized Trial. **Diabetes Care.**, Alexandria, v.38, n. 11, p. 2134-2141, 2015

DICSON, S.M et al. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* safety profile of the Indian traditional medicinal plant *Grewia tiliaefolia*. **Regul Toxicol Pharmacol.**, New York, v. 73, n. 1, p. 241-7, 2015

DORNAS W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn.**, São Paulo, v.19, n.2, p. 488-500, 2009

EMPRESA BAIANA DE ALIMENTOS. Disponível em:
<www.ebal.ba.gov.br/novagestao>. Acesso em: 28/12/2011.

EFRAIM, P. et al. Teores de compostos fenólicos de sementes de cacaueteiro de diferentes genótipos. **Braz J Food Technol.**, Campinas, v.9, n.4, p. 229-236, 2006

EIZIRIK, D.L.; MIANI, M.; CARDOZO, A.K. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Diabetologia.**, Berlin, v. 56, p. 234-241, 2013

ELSNER, M. et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia.**, Berlin, v.43, p.1528-1533, 2000

ENCINA, C. L. *Annona* spp. Atemoya, cherimoya, soursop and sugar apple. In: LITZ, R.E. (ed) *Biotechnology of Fruits and Nut Crops (Org.)* In: **Biotechnology in Agriculture Series**, 29. Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 2005, p. 74-87

ENDHARTI, A.T. et al. Cutting edge: CD8 + CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. **J Immunol.**, Baltimore, v. 175, p. 7093-7097, 2005.

ESCOBAR-KHONDIKER, M. et al. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. **J Neurosci.**, Baltimore, v. 27, n. 7827-7837, 2007

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **J Agric Food Chem.**, Washington, v. 58, p. 8.139-144, 2010

FERRE, T. et al. Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. **FASEB J.**, Bethesda, v. 10, n. 10, p. 1213-1218, 1996

FERNANDES, A.P.M. et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. **Ver Latinoam Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.13, n.5, p.743-749, 2005

FLORENCE, N.T. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v.151, n. 2, p. 784-790, 2014

FRANZÃO, A. A.; MELO, B. **Cultura das anonáceas: gravioleira** (2007). Disponível em: < <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/anonaceas.htm> > Acesso em: 15 fev. 2013

- FRASNELLI, S. C et al. Modulation of immune response by RAGE and TLR4 signaling in PBMC cells of diabetic and non diabetic patients. **Scand. J Immunol.**, Baltimore, v.81, n. 1, p. 66-71, 2014
- FRASAKIN, A. O. et al. Compositional analyses of seed of soursop, *Annona muricata* L. as a potential animal feed supplement. **Scient Res Essay.**, Abraka, v. 3, p. 521-523, 2008
- FRIGERIO, S. et al. Cells Are Responsible for Cxcr3-Mediated T-Cell Infiltration in Insulinitis. **Nat Med.**, New York, v. 8, n.12, p.1414-1420, 2002.
- FOSS-FREITAS, M.C. et al. Effect of metabolic control on interferon- γ and interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells from type 1 and type 2 diabetic patients. **Braz J Med Biol Res.**, Ribeirão Preto, v.40, p.671-677, 2007
- GBEASSOR, M., et. al. *In Vitro* Antimalarial Activity of Six Medicinal Plants. **Phytother Res.**, Malden, v. 4, n.3, p.115-117, 1990
- GEPTS, W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes.**, New York, v.14, n. 619-633, 1965
- GRAY, A.M.; FLATT, P. R. Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). **Br J Nutr.**, London, v.78, n. 2, p. 325-334, 1997
- GRAY, A.M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulin-like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). **J Endocrinol.**, London, v.157, p. 259-266, 1998
- GRAY, A.M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulinlike activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (Coriander). **Brit J Nutr.**, London, v. 81, p. 203-209, 1999
- GRIECO, F. A. et al. IL-17A increases the expression of proinflammatory chemokines in human pancreatic islets. **Diabetologia.**, Berlin, v.57, n.3, p.502-511, 2013
- GRINGAS, V. et al. Association between Cardiometabolic Profile and Dietary Characteristics among Adults with Type 1 Diabetes Mellitus. **J Acad Nutr Diet.**, Chicago, v. 115, n. 12, p. 1965-1974, 2015.
- GRZYBOWSKI, A. et al. The combined action of phytolavicides for the control of dengue fever vector *Aedes aegypti*. **Braz J Pharmacogn.**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 549-557, 2012
- GUINAZI, M. et al. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009

- GULLE, K. et al. The effects of dexpanthenol in streptozotocin-induced diabetic rats: Histological, histochemical and immunological evidences. **Histol Histopathol.**, Gutenberg, v. 29, p.1-9, 2014
- HASRAT, J. A. et al. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **J Pharm Pharmacol.**, London, v. 49, n. 11, p. 1145-1149, nov., 1997
- HEINRICH, M. et al. Parasitological and Microbiological Evaluation of Mixe Indian Medicinal Plants (Mexico). **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 36, n. 1, p.81-85, 1992
- HOLEMANS, K et al. Maternal Semi starvation and Streptozotocin-Diabetes in Rats have different effects on the in Vivo glucose uptake by peripheral tissues in their female adult offspring. **J Nutrition.**, Philadelphia, v. 127, p.1371-1376, 1997
- HÖLLERHAGE, M. et al. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. **Exp Neurol.**, New York, v.220, n.1, p. 133-142, 2009
- HÖLLERHAGE, M. et al. Neurotoxicity of Dietary Supplements from Annonaceae Species. **Int J Toxicol.**, Washington, v. 26, p. 1-8, 2015
- HONEYMAN, M.C et al. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. **J Immunol.**, Baltimore, v.184, p. 2204-2210, 2010
- HUO, Y. et al. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytother Res.**, London, v.17, p. 48-55, 2003
- IMAEDA, A. et al. DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice. **Food Chem Toxicol.**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 979-987
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.** 4.ed. IAL: São Paulo, 2008
- IN'T VELD, P. Insulitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models. **Semin Immunopathol.**, Berlin, v. 36, n. 5, p. 569-579, 2014
- ISHOLA, I. O et al. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. **J Med Food.**, Larchmont, v. 17, n. 12, p. 1375-1382, 2014
- ISRAEL, L. L. et al. Acute in vivo toxicity mitigation of PEI-coated maghemite nanoparticles using controlled oxidation and surface modifications toward siRNA delivery. **ACS Appl Mater Interfaces.**, New York, v.7, n. 28, 2015

ITO, M. et al. New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. **Biol Pharm Bull.**, Tokyo, v. 22, n. 9, p. 988-989, 1999

ITOH Y, HINUMA S. GPR40, a free fatty acid receptor on pancreatic beta cells, regulates insulin secretion. **Hepatol Res.**, Amsterdam, v. 33, p.171-173, 2005

ITOH, Y. et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. **Nature.**, London, v.422, p.173-176, 2003

JENG, J.Y. et al. Linoleic acid promotes mitochondrial biogenesis and maintains mitochondrial structure for prevention of streptozotocin damage in RIN-m5F cells. **Biosci Biotechnol Biochem.**, Tokyo, v. 73, n. 6, p.1262-1267, 2009

JIN, Z. G.; BERK, B.C. Role of secreted oxidative stress-induced factors (SOXFs) in the pathogenesis of atherosclerosis. **Arch Mal Coeur Vaiss.**, Paris, v. 97, n. 12, p. 1256-1259, 2004

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. **J AOAC Int.**, Arlington, v. 75, p. 488-506, 1992.

KAMBOJ, S.S.; SANDHIR, R. Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. **Mitochondrion.**, Amsterdam, v.11, p.214-222, 2011

KARLSSON-FARESJÖ, M. G.; ERNERUDH, J.; LUDVIGSSON, J. Cytokine profile in children during the first 3 months after the diagnosis of type 1 diabetes. **Scand J Immunol.**, Oslo, v.59,n. 5, p. 517-526, 2004.

KATZ, J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. **Eur J Immunol.**, Weinheim, v. 23, n.12, p.3358-3360, 1993

KATZ, S.M. Efficacy of ICAM-1 antisense oligonucleotide in pancreatic islet transplantation. **Transplant Proc.**, New York, v. 27, n. 6, p. 3214, 1995

KIMPIMÄKI, T. et al. Short-term exclusive breastfeeding predisposes young children with increased genetic risk of Type I diabetes to progressive beta-cell autoimmunity. **Diabetologia.**, Berlin, v. 44, n. 1, p. 63-69, 2001

KNIP, M.; SIMELL, O. Environmental triggers of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, New York, v. 2, n. 7, p. 1-15, 2012

KNIP, M.; VIRTANEN, S.M.; AKERBLUM, H.K. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v. 91, n. 5, p. 1506-1513, 2010

- KO, Y. M et al. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 137, n. 3, p.1283-1290, 2011
- KRISHNA MOHAN, I; DAS, U.N. Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by polyunsaturated fatty acids. **Nutrition.**, Burbank, v. 17, n.2, p. 126-151, 2001
- LANNUZEL, A. et al. 2003. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience.**, Oxford, v.121, p. 287-296, 2003
- LARSEN, L. et al. Extracellular signal-regulated kinase is essential for interleukin-1-induced and nuclear factor kappaB-mediated gene expression in insulin-producing INS-1E cells. **Diabetologia.**, Berlin, v. 48, n.12, p. 2582–2590, 2005
- LEE, Y.H. et al. An appraisal of eighteen commonly consumed edible plants as functional food based on their antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities. **J Sci Food Agric.**, Oxford, v. 95, n. 14, p.2956-2964, 2014
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia.**, Berlin, v.51, n.2, p. 216-226, 2008
- LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras.**, São Paulo, v.18, n.2, p. 132-142, 2003
- LIAW, C.C et al. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. **Planta Med.**, Stuttgart, v.76, n.13, p. 1390-1404, 2010
- LI, W. L. et al. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 92, p. 1-21, 2004.
- LIEBERMAN, S.M. et al. Identification of the β Cell Antigen Targeted by a Prevalent Population of Pathogenic Cd8+ T Cells in Autoimmune Diabetes. **Proc Natl Acad Sci US A.**, Washington, v. 100, n.14, p.8384-8388, 2003
- LIKE, A.A., ROSSINI, A.A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. **Science.**, Washington, v.193, p.415-417. 1976
- LIMA J. A et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of an acid fraction of the seeds of *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) (Flacourtiaceae). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.38, n.7, p.1095-1103, 2005.
- LINDSEY, E. et al. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v. 1281, p. 16-35, 2013

LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 A diabetes mellitus-associated autoimmunity. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, Philadelphia, v.31, p. 391-410, 2002

LÓPEZ, Sergio et al. The influence of major dietary fatty acids on insulin secretion and action. **Cur. Opin. Lipidol.**, London, v.21, p. 15-20, 2010

LUNA, J.D.S. et al. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. **Nat Prod Res.**, Abingdon, v. 20, p. 253-257, 2006

MALEKIFARD, F. et al. Immunotherapeutic effects of pentoxifylline in type 1 diabetic mice and its role in the response of T-helper lymphocytes. **Iran J Basic Med Sci.**, Mashhad, v.18, n.3, p. 247-252, 2015

MARINELI RS, et al. Chemical characterization and antioxidant potential of Chilean chia seeds and oil (*Salvia hispanica* L.). **Food Scien Technol.**, Campinas, v. 59, p.1304-1310, 2014

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 2, p. 137-189, 1995

MASTROCOLA, R. et al. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. **J Endocrinol.**, London, v.187, p.37-44, 2005

MATHERS, C. D, LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 3, n. 11, p. 442, 2006

MATHIS, D.; BENOIST, C. Back to Central Tolerance. **Immunity.**, Cambridge, v. 20, n. 5, p. 509-516, 2004

MAYNERIS-PERXACHS, J. et al. Effects of 1-year intervention with a Mediterranean diet on plasma fatty acid composition and metabolic syndrome in a population at high cardiovascular risk. **PLoS One.**, San Francisco ,v. 9, n.3, p. 1-11, 2014

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc Tecnol Aliment.**, Campinas, v. 26, n.3, p. 639-644, 2006

MEJÍA-LEÓN, M.E.; RUIZ-DYCK, K.M.; CALDERÓN DE LA BARCA, A.M. HLA-DQ genetic risk gradient for type 1 diabetes and celiac disease in North-Western Mexico. **Rev Gastroenterol Mex.**, Mexico, 2015, 80, 135–143.

MEJÍA-LEÓN, M.E.; CALDERÓN DE LA BARCA, A.M. Diet, Microbiota and Immune System in Type 1 Diabetes Development and Evolution. **Nutrients.**, Basel, v. 7, p. 9171-9184, 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília, DF, 2006. 60 p.

MIKULKOVA, Z. et al. Numerical defects in CD8 + CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. **Cell Immunol.**, New York, v. 262, p. 75-79, 2010

MI, Q. S. et al. Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. **Diabetes.**, New York, v.53, n. 5, p. 1303-1310, 2004

MORAN, A. et al. Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. **Lancet.**, London, v. 381, n. 9881, p.1905-1915, 2013

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. Gastroprotective activity of *Annona muricata* leaves against ethanol-induced gastric injury in rats via Hsp70/Bax involvement. **Drug Des Devel Ther.**, Macclesfield, v. 28, n. 8, p. 2099-2110, 2014

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **Int J Mol Sci.**, Basel, v.16, p.15625-15658, 2015

MONTERRAT-DE LA PAZ, S. et al. The sterols isolated from Evening Primrose oil modulate the release of proinflammatory mediators. **Phytomedicine.**, Stuttgart, v. 19, p. 1072-1706, 2012.

MONTERRAT-DE LA PAZ, S. et al. Long-chain fatty alcohols from evening primrose oil inhibit the inflammatory response in murine peritoneal macrophages. **J Ethnopharmacol.**, Limerick, v.151, p.131-136, 2014

MORGAN, N. G. Fatty acids and beta-cell toxicity. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, London, v. 12, p. 117-122, 2009

MORGAN, N. G. et al. The cytoprotective actions of long-chain mono unsaturated fatty acids in pancreatic beta-cells. **Biochem Soc Trans.**, London, v. 36, p.905-908, 2008

MOSMANN, Tim. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J Immunol Meth.**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983

NAKAYAMA, M. et al. Prime Role for an Insulin Epitope in the Development of Type [Thinsp]1 Diabetes in Nod Mice. **Nature.**, London, v. 435, n. 7039, p.220-223, 2005

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev Bras Ciênc Farm.**, São Paulo, v.41, n.2, p.121-142, 2005.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C.; MAIA, M. L. Produção e comercialização de anonáceas em São Paulo e Brasil. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 35, n. 2, fev. 2005.

NOLAN, C.J. et al. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. **Diabetes.**, Quebec, v. 55, p.16-23, 2006

NORRIS, J. M. et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. **JAMA.**, Chicago, v. 290, p. 1713-1720, 2003

NORRIS, J.M. et al. Ômega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. **JAMA.**, Chicago, v. 298, p.1420-1428, 2007

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 2 ed. Campinas, SP: Nepa-Unicamp, 2006. 113p.

ODEGAARD, J.I.; CHAWLA, A. Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, New York, v.2, n.3, p. 1-18, 2012

OLALLA L. M. S.; MUNIZ, F. J. S.; VAQUERO, M. P. N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity, **Nutr Hosp.**, Madrid, v. 24, n. 2, p. 113-127, 2009

ONENGUT-GUMUSCU, S.; CONCANNON, P. Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model. **Immunol Rev.**, Copenhagen, v.190, p.182-194, 2002

ORTA-GARCÍA, S.T. et al. Analysis of cytotoxic effects of silver nanoclusters on human peripheral blood mononuclear cells 'in vitro'. **J Appl Toxicol.**, Chichester, v. 35, n. 10, p.1189-1199, 2015

ORTIZ-AVILA, O. et al. Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. **J Diabetes Res.**, Cairo, v. 2015, p.1-9, 2015

ORTIZ, M. D. C. et al. Mitochondrial dysfunction in brain cortex mitochondria of STZ-diabetic rats: effect of L-arginine. **Neurochem Res.**, New York, v. 38, n. 12, p. 2570-2580, 2013.

PAPYRUS EBERS: **The Greatest Egyptian Medical Document**. Copenhagen, Levin and Munksgaard, 1937

PADGETT, L. E. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v.1281, p.16-35, 2013

PETTITT, D.J. et al. Prevalence of diabetes in U.S. Youth in 2009: The search for diabetes in youth study. **Diabetes Care.**, Alexandria, v. 37, p. 402-408, 2014

- PETROVSKY, N. et al. The Role of Fas Ligand in Beta Cell Destruction in Autoimmune Diabetes of Nod Mice. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v.958, n.1, p. 204-208, 2002
- PINTO, L.C. et al. Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante das sementes da *Carpotroche brasiliensis* (Raddi). **Rev Ciênc Méd Biol.**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 170-6, 2012
- PODACK, E.R. et al., Function of granule perforin and esterases in T cell-mediated reactions. Components required for delivery of molecules to target cells. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v. 532, p. 292-302, 1988
- POCIOT, F. et al. Genetics of type 1 diabetes: What's next? **Diabetes.**, Quebec, v. 59, p. 1561-1571, 2010
- RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; NADKARNI, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). **Cancer Chemother Rep.**, Bethesda, v. 29, p. 91-98, 1963
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors.**, Basel. v.12, n. 9, p.12347-12360, 2012
- RAHAVI, H. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exert in vitro immunomodulatory and beta cell protective functions in streptozotocin-induced diabetic mice model. **J Diabetes Res.**, Cairo, v. 2015, p. 1-10, 2015
- REDONDO, M.J. LADA: time for a new definition. **Diabetes**, Quebec, v.62, p. 339-340, 2013.
- RICE-EVANS, C., MILLER, N.J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochem Soc Trans.**, London, v. 24, n. 790-795, 1996
- RIESER, M. J. et al. Muricatacin: a Simple Biologically Active Acetogenin Derivative from the Seeds of *Annona Muricata* (Annonaceae). **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v. 32, n.9, p.1137-1140, 1991
- RITTER, L. L. N. et al. Treinamento físico por natação melhora perfil hepático em ratos wistar tratados com dieta hiperlipídica. **Coleção Pesquisa em Educação Física**, Várzea Paulista, v.11, n.2, p. 183-190, 2012
- ROCHA, A.I.; REIS LUZ, A.I.; RODRIGUES, W.A. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. III-Anonaceae. **Acta Amaz.**, Manaus, v.11, n.3, p.537-541, 1981.
- ROCHA, W.S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev Bras Frut Jaboticabal**, Jaboticabal, v .33, n. 4, p.1215-1221, 2011

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc.Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007

RUFINO et al. **Comunicado Técnico**. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Embrapa, 2006

RUFINO et al. **Comunicado Técnico**. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela captura do radical ABTS. Embrapa, 2007

SALMARJI, R.; BALBAA, M. Anti-diabetic activity of different oils through their effect on arylsulfatases. **J Diabetes Metabol Disord.**, London, v. 13, n.116, p 1-8, 2014

SANTIAGO, Fernando. **Informações sobre a graviola**. Disponível em: <<http://www.fernandosantiago.com.br/gravioca.htm>> Acesso em: 15 fev. 2013.

SANTOS, F. et al. Avaliação da atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonóides totais de quatro cultivares de anona da Madeira (*Annona cherimola*, Mill.) Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, **Observações boletim epidemiológico**. v. 2, p.7-9, 2014.

SANTOS, R. D. et al. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol.**, Rio de Janeiro, 100, P. 1-40, 2013

SANTOS, A. S. R. **Biodiversidade, Bioprospeção, conhecimento tradicional e o futuro da vida**. Disponível: <<http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>>. Acesso em: set. 2012.

SCHAPIRA, A.H. Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. **Exp Neurol.**, New York, v. 224, n. 2, p. 331-335, 2010

SHI-FENG, Y. A. et al. Induction of tolerance and prolongation of islet allograft survival by syngeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice **Transplant Immunol.**, Dunto Grenn, v. 33, p. 130-139, 2015

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Amer J Clin Nutr.**, Bethesda, v. 62, n. 6, p.1315-1321,1995.

SILVA, L.M.; NEPOMUCENO, J. C. Efeito modulador da polpa da graviola (*Annona muricata*) sobre a carcinogenicidade da mitomicina C, avaliado por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Rev Núcleo Inter Pesq Ext.**, Patos de Minas, v. 1 n. 8, p. 80-94, 2011

SIMMONS, K.; MICHELS, A.W. Lessons from type 1 diabetes for understanding natural history and prevention of autoimmune disease. **Rheumatic Dis. Clin. N. Am.**, Maryland Heights, v. 40, p. 797–811, 2014

SKYLER, J.S. Toward primary prevention of type 1 diabetes. **JAMA.**, Chicago, v. 313, p. 1520–1521, 2015

SIVAPRIYA, M.; GOWDA, S. S.; SRINIVAS, L. Protective effect of sundakai (*Solanum torvum*) seed Protein (SP) against oxidative membrane damage in human erythrocytes. **J Membr Biol.**, New York, v. 248, n.6, p.1137-1144, 2015

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014**. Grupo Editorial Nacional: Rio de Janeiro, 2013. 365 p.

STASSI, G. et al. Nitric Oxide Primes Pancreatic Beta Cells for Fas-Mediated Destruction in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **J Exp Med.**, New York, v.186, n.8, p.1193-1200, 1997

SUK, K. et al. IFN- γ /TNF- α Synergism as the final effector in autoimmune diabetes: A Key Role for Stat1/IFN regulatory Factor-1 Pathway in Pancreatic β Cell Death. **The J Immunol.**, Bethesda, v. 166, n. 7, p. 4481-4489, 2001

SWANSTON-FLATT, S. K. et al. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. **Diabetologia.**, Berlin, v. 33, p. 462-464, 1990

TAURINO, F. et al. Mitochondrial proteome analysis reveals depression of the Ndufs3 subunit and activity of complex I in diabetic rat brain. **J Proteomics.**, Valencia v. 75, n. 8, p. 2331-2341, 2012

TRIGR Study Group 2011. The Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR) study: Recruitment, intervention and follow-up. **Diabetologia.**, Berlin, v. 54, p. 627-633, 2011.

THOMAS, H.E. et al. Beta cell apoptosis in diabetes. **Apoptosis.**, London, v. 14, p. 1389-1404, 2009

TOLDI, G. et al. Lymphocyte activation in type 1 diabetes mellitus: the increased significance of Kv1.3 potassium channels. **Immunol Lett.**, Genova, v.133, p. 35-41, 2010

TONG, Z. et al. Interleukin-17A deficiency ameliorates streptozotocin induced diabetes. **Immunology.**, Oxford, v.146, n. 2, p. 339-346, 2015

TORRES, N.; NORIEGA, L.; TOVAR, A.R. Nutrient modulation of insulin secretion. **Vitam Horm.**, New York, v. 80, p. 217-244, 2009

- TURK, J. et al. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v.197, p.1458-464, 1993.
- ULICNÁ, O. et al. Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) partially prevents oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Physiol Res.**, Praha, v. 55, p.157-164, 2006
- VAARALA, O.; ATKINSON, M. A.; NEU, J. A. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. **Diabetes.**, Quebec, v. 57, n.10, p. 2555-2562, 2008
- VAN BELLE, T.L.; COPPIETERS, K.T., VON HERRATH, M.G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev.**, Praha, v. 91, n. 1, p. 79-118, 2011
- VARANASI, V. et al. Cytotoxic mechanisms employed by mouse T cells to destroy pancreatic β -cells. **Diabetes.**, Quebec, v. 61, p. 2862-2870, 2012
- VASSILIOU, E. K. et al. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems. **Lipids Health Dis.**, London, v. 8, p.25–35, 2009
- VILA-NOVA, N.S. et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Brasília, v.44, p. 567-571, 2011
- VYSAKH, A. et al. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **Internat Immunopharmacol.**, Omaha, v. 20, p.124-130, 2014
- VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev Bras Plantas Med.**, Campinas, v. 4, p.35-45, 2002.
- VOLTARELLI, J. C. Transplante de células-tronco hematopoéticas no diabetes melito do tipo I. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, São Paulo . v. 26 n. 1, 2004
- WEIDE, L.G, LACY, P. E. Low-dose streptozocin-induced autoimmune diabetes in islet transplantation model. **Diabetes**, Quebec, v. 40, n. 9, p.1157-1562, 1991.
- WEIJL, N. I., CLETON, F. J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, New York, v. 23, n.4, p. 209- 240, 1997.
- WILLCOX, A. et al. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol.**, London, v. 155, p.173-181, 2009
- WOO, W. et al. A novel high-throughput method for accurate, rapid, and economical measurement of multiple type 1 diabetes autoantibodies. **J Immunol Meth.**, Amsterdam, v. 244, p. 91-103, 2000

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**. Fact sheet N°312, março 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>> Acesso em: 05 fev. 2013a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Traditional medicine**. Fact sheet N°134, maio 2003 Disponível em: <http://www.who.int/topics/plants_medicinal/en/> Acesso em: 05 fev 2013b.

WU, F. et al. Two new cytotoxic monotetrahydrofuran Annonaceous acetogenins, anomuricins A and B, from the leaves of *Annona muricata*. **J Nat Prod.**, Cincinnati, v. 58, n. 6, p. 830-836, jun.,1995

WU, X. et. al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **J Agric Food Chem.**, Washington, v.52, p. 4026-4037, 2004

YUAN, S. S. et al. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests_cancer_cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. **Life Sci.**, Oxford, v.72, n.25, p. 2853-2861, 2003

ZAKARIA, Z. A. et al. Hepatoprotective activity of dried- and fermented-processed virgin coconut oil. **Evid Based Complement Alternat Med.**, Cairo, v. 2011, p.1-8, 2011

Apêndices

APÊNDICE A



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS**
Instituto de Ciências da Bahia
Universidade Federal da Bahia



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO DA GRAVIOLA EM PACIENTES DIABÉTICOS”**. Nesta pesquisa, pretendemos avaliar se o óleo da semente da graviola é capaz de contribuir para o tratamento da diabetes. O motivo que nos leva a pesquisar esse assunto é **por que pode ser que o óleo da graviola seja um bom remédio para o tratamento da diabetes**. Para esta pesquisa faremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): 1- **Pegar um pouco de seu sangue**; 2- **Deixar as células do sangue em contato com o óleo da graviola**; 3- **Observar o crescimento das células**; 4- **Ver se o óleo melhora a saúde das células**.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) de qualquer dúvida e estará livre para participar ou não participar. O responsável por você poderá interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e caso você não queira participar, isso não irá modificar o seu atendimento pelo pesquisador. Seu nome não será dito e identificado em nenhuma publicação. No momento da coleta do sangue pode haver alguma dor leve ou desconforto decorrente do uso da seringa. Em nenhum momento os nomes dos pacientes serão expostos ou divulgados. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais: sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você. Os

pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas *dúvidas*.

Salvador, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do (a) menor

Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS**
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(No caso do responsável pelo menor)

O menor _____, sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO DA GRAVIOLA EM PACIENTES DIABÉTICOS**”. Nesta pesquisa, pretendemos avaliar se o óleo da semente da graviola é capaz de diminuir a inflamação da diabetes autoimune. O motivo que nos leva a pesquisar esse assunto é a **possibilidade de utilizar as sementes da graviola como terapia para o tratamento da diabetes, visando melhorar qualidade de vida dos pacientes diabéticos**. Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): **1-Coletar sangue de paciente diabéticos. 2- Separar as células do sangue colhido; 3- Observar o crescimento das células em exposição ao óleo da semente de graviola; 4- Avaliar ação anti-inflamatória do óleo**. Para participar desta pesquisa, o menor sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Ele será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Você, como responsável pelo menor, poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação dele a qualquer momento. A participação dele é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido (a) pelo pesquisador que irá tratar a identidade do menor com padrões profissionais de sigilo. O menor não será identificado em nenhuma publicação. Esta pesquisa pode apresentar algum risco no momento da coleta de sangue de haver alguma dor ou desconforto decorrente da punção da pele. Em nenhum momento os nomes dos pacientes serão expostos ou divulgados. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. O nome ou o material que indique a participação do menor não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável, por um período de 5(cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS**
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia



encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório Imunobio, do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA) e a outra será fornecida ao senhor.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, responsável pelo menor _____, fui informado (a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar a decisão do menor sob minha responsabilidade de participar, se assim o desejar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Salvador, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do (a) Responsável

Assinatura do (a) Pesquisador (a)

Em caso de desistência **do menor, sob minha responsabilidade**, em permanecer na pesquisa, autorizo que os dados já coletados referentes a resultados de exames, questionários respondidos, etc, ainda sejam utilizados na pesquisa, com os mesmos propósitos já apresentados neste TCLE.

Nome

Assinatura do Responsável

Data

Anexos

ANEXO A



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa de protocolo número **029/2012**, intitulado **"Rede de pesquisa e inovação em bioprospecção no semiárido Baiano: Uma abordagem multidisciplinar"**, sob a responsabilidade da Professora Doutora Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, lotada no Departamento de Biorregulação do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), está de acordo com as exigências legais atuais para experimentação animal e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), tendo sido **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) em **11 de maio de 2012**.

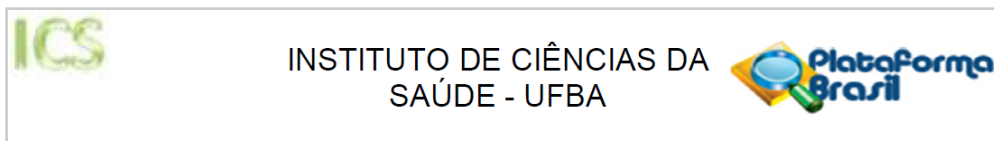
CERTIFICATE

We certify that the research project with protocol number **029/2012** entitled **" Research network on pharmacological, potential of species from Bahia's dry/dessert areas: A multidisciplinary approach"**, under the responsibility of Professor Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, in the Biorregulação Department of the Institute of Health Sciences (ICS), Federal University of Bahia (UFBA). The presented project is in agreement to the Brazilian Law on Animal Experimentation and with the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian Society of Animal Science Laboratory (SBCAL) and was **approved** by this Ethics Committee on Animal Use of the Institute of Health Sciences (CEUA-ICS) on **September 14, 2012**.

Salvador, 14 de setembro de 2012.

Profª Dra. Songeli Menezes Freire
Coordenadora da CEUA-ICS

ANEXO B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO DA GRAVIOLA EM PACIENTES DIABÉTICOS

Pesquisador: Laise Pinto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42063415.9.0000.5662

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.092.591

Data da Relatoria: 28/05/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto que pretende avaliar a propriedade farmacológica da semente de graviola, em especial do óleo extraído das sementes, com possíveis efeitos imunomoduladores em diabetes auto-imune. Possibilitando a utilização e aplicação das sementes como potencial agente terapêutico para o tratamento dessa doença visando melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL:

Avaliar o potencial imunomodulador in vitro do óleo da semente da graviola em células mononucleares do sangue periférico de pacientes diabéticos e controles saudáveis.

ESPECÍFICOS:

- Cultivar células de sangue total e/ou células mononucleares de sangue periférico de pacientes diabéticos e controles
- Avaliar perfil de citocinas Th1/Th2 e Treg em cultivos celulares de sangue total e/ou de células mononucleares de pacientes diabéticos e controles
- Avaliar expressão gênica de citocinas IL-10, IL-4, TGF- e TNF- em células de sangue periférico

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

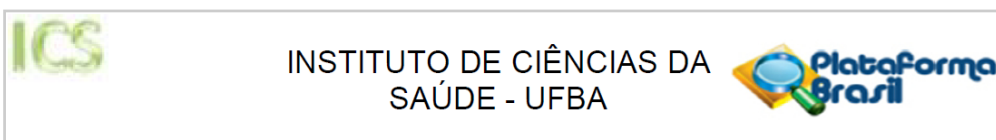
UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cep.ics@outlook.com



Continuação do Parecer: 1.092.591

de pacientes diabéticos e controles.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo oferece risco mínimo aos voluntários visto que os procedimentos de coleta de amostras de sangue, cultura de sangue, das células mononucleares, dosagem de citocinas serão realizadas por profissionais especializados nas atividades.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância científica devido a possibilidade de criar terapêutica utilizando-se de fármacos alternativos. Observa-se a indicação de comprovação científica da utilização do óleo de semente com baixo custo na preparação, e na eficácia terapêutica, e possíveis imunomoduladores em diabetes autoimune intensificando o aproveitamento sustentável dessa planta que é subutilizada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores cumpriram as exigências quanto aos termos de apresentação obrigatória.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências. O pesquisador respondeu o questionamento sobre a carta de anuência satisfatoriamente realizando a modificação solicitada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 em substituição à Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d). O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da

Endereço: Miguel Calmon	CEP: 40.110-902
Bairro: Vale do Canela	
UF: BA	Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-8951	E-mail: cep.ics@outlook.com



INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE - UFBA



Continuação do Parecer: 1.092.591

pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata. O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA junto com seu posicionamento. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 30/11/2015 e ao término do estudo. Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde/UFBA, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

SALVADOR, 03 de Junho de 2015

Assinado por:
ANA PAULA CORONA
(Coordenador)

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cep.ics@outlook.com

ANEXO C



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 011/2014

PROJETO: "Investigação sobre efeitos imunomodulatórios de extratos vegetais e de helmintos em populações celulares do sistema imune humano *in vitro* e em modelos experimentais de alergia respiratória e autoimunidade"

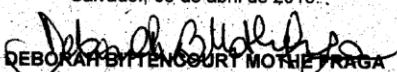
COORDENADOR: Dr. Lain Pontes de Carvalho

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongo BALB/c	200
Camundongo AJ	300
Camundongo C57BL/6	200
Ratos Wistar	100

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 06/04/2015, e tem validade até 06/04/2017.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 04/06/2015, being valid until 04/06/2017.

Salvador, 06 de abril de 2015.


 DEBORAH BITTENCOURT MOTIE PRAGA
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ