UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atividades anti-diabética, anti-inflamatória e toxicologia de Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson - Asteraceae

Rejane Barbosa de Oliveira

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atividades anti-diabética, anti-inflamatória e toxicologia de Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson -Asteraceae

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientada: Rejane Barbosa de Oliveira
Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da

Costa

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Rejane Barbosa de

Atividades anti-diabética, anti-inflamatória e toxicologia de Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson -Asteraceae. Ribeirão Preto, 2011.

76 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Da Costa, Fernando Batista

1. Yacón. 2. Smallanthus sonchifolis. 3. Atividades Biológicas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Rejane Barbosa de Oliveira

Título do trabalho: Atividades anti-diabética, anti-inflamatória e toxicologia de

Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson - Asteraceae

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Aprovado em:

Banca Julgadora

Prof. Dr		
	Assinatura:	
Prof Dr		
Prof. Dr Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
	Assinatura:	
Prof. Dr		
	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:		

	Dedicatória
Dedico este trabalho aos m	ais de 190 milhões de brasileiros, que com seu suor
	pagam toda a pesquisa e ensino público deste país.

Agradecimentos

À CAPES e à FAPESP pelas bolsas e apoio financeiro concedidos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, pela orientação dada com tanto entusiasmo, dedicação, sabedoria e paciência. Agradeço, ainda, por todas as oportunidades que me concedeu e pelas inúmeras discussões sobre a vida e sobre ética em pesquisa. Prof. Fernando, desejo a você muitas felicidades e sucesso sempre!

Ao Prof. Dr. Jairo K. Bastos por todo apoio e por estar sempre disposto a ajudar no que fosse necessário.

À Profa. Dra. Niege pela luta para tornar a Universidade um lugar melhor!

À Profa. Dra. Ana Maria Soares e à Profa. Dra. Beatriz da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP) por terem concedido os rizóforos para o plantio do yacón.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura da FCFRP-USP e ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos da FFCLRP-USP pelo suporte técnico e científico para o desenvolvimento do ensaio de toxicidade.

Aos técnicos João Franco e Reinaldo pela amizade e por terem me ensinado todas as técnicas de manipulação dos animais, bem como por toda a discussão sobre a ética que envolve a experimentação com animais de laboratório. Franco e Reinaldo, devo muito a vocês!

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli da FCFRP-USP pelo suporte técnico e científico para a realização dos ensaios de atividade anti-inflamatória *in vitro*, à sua aluna Adriana Secatto e ao técnico Carlos, por terem me ensinado as técnicas necessárias. Dri, muito obrigada por toda a paciência!

À Profa. Dra. Ana Paula Campaneli da FOB-USP pelo suporte técnico e científico para a dosagem da mieloperoxidase e IL-10, e à Dra. Thais Helena Gasparoto, por ter me ensinado as técnicas necessárias.

À Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira pela amizade e suporte técnico e científico.

À Profa. Dra. Mônica Talarico Pupo e à Andréia pela ajuda e apoio.

Ao Prof. Dr. Norberto P. Lopes pela ajuda e por acreditar em minhas capacidades.

Ao Prof. Dr. Leonardo Gobbo-Neto pela colaboração e ajuda nas análises fitoquímicas.

A toda comunidade USP por todo apoio e presteza, em especial aos funcionários, alunos e docentes da FFCLRP-USP e FCFRP-USP. Agradeço com muito carinho aos funcionários do Restaurante Universitário, da Biblioteca Central do *campus* (em especial ao Sr. Luís, à Kátia e à Val), do SISUSP (em especial à enfermeira Silvana), do Conselho Gestor, e ao Sr. Horácio (motorista do circular da USP), pela dedicação e carinho durante toda a minha graduação e pós-graduação.

A todos os amigos do Laboratório de Farmacognosia, em especial à Daniela Aparecida por ter colaborado em todos os experimentos realizados, dando ajuda intelectual na preparação dos protocolos, física na hora de carregar as caixas dos animais e equipamentos e, principalmente, muito apoio e carinho quando nada dava certo. Dani, muito obrigada mesmo! Deixo meu agradecimento especial ao João Paulo, à Renata e ao Willian, por terem me ensinado a utilizar vários equipamentos no laboratório. Ao Bruno e à Danniela Faleiro por toda ajuda dada durante os experimentos. Agradeço aos amigos Niltinho, Vanessa, Flávia, Cristiane, Ricardo, Mauro, Mariza, Eliane, Tatiane, Juliana Canela e Juliana Carvalho, que contribuíram sempre dando dicas, apoio, ou simplesmente com uma conversa descontraída na hora do almoço. Amigos, desejo a vocês muito sucesso!

Aos amigos da Associação de Pós-graduandos de Ribeirão Preto (APG-RP/USP), em especial ao Dawit (FMRP-USP), Willian (FCFRP-USP), Danilo (FCFRP-USP), Vanessa (FMRP-USP) e Mirna (FEA-USP) pela amizade, realizações e inúmeras discussões sobre política universitária. Amigos, sentirei muitas saudades!

À amiga Carolina Xaurbert pelas longas conversas no ônibus. Obrigada Carol!

À amiga Paula Bueno pelo incentivo e apoio em vários momentos. Paulinha, desejo que você seja muito feliz!

Ao técnico Mário Ogasa e ao Sr. Nivaldo por toda ajuda dada no plantio do yacón.

Ao meu querido Antonio César Guardia, pela paciência e por todos os finais de semana e feriados perdidos.

RESUMO

OLIVEIRA, R. B. Atividades anti-diabética, anti-inflamatória e toxicologia de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson - Asteraceae. 2011. 76 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae), conhecida popularmente como yacón, é um erva utilizada na medicina popular para o tratamento do diabetes. A ação hipoglicemiante do extrato aquoso das folhas do yacón foi comprovada em estudos recentes realizados por outros autores em animais diabéticos. Análises fitoquímicas preliminares revelaram que a espécie é rica em lactonas sesquiterpênicas (LST) e em derivados dos ácidos clorogênicos (ACG). Ambas as classes de substâncias possuem inúmeras atividades biológicas, como ação antioxidante, anti-inflamatória, e inibidora de enzimas que podem contribuir no quadro de melhora do estado diabético. Contudo, ainda não está comprovado se as atividades biológicas da espécie são resultantes da ação dos ACG ou das LST. Adicionalmente, análises toxicológicas do consumo das folhas do yacón ainda não foram realizadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar três extratos preparados com folhas do yacón, com o intuito de analisar o papel das diferentes classes químicas no desenvolvimento das atividades biológicas descritas para a espécie, bem como de seus potenciais efeitos tóxicos. Os extratos obtidos foram: o extrato aquoso (EA), no qual foram detectados tanto ACG (2,0 e 1,3 µg/mL dos picos mais intensos), quanto LST (99,7 e 319,0 μg/mL dos picos mais intensos); extrato de lavagem foliar (ELF), rico em LST (1257,4 e 1997,7 µg/mL das majoritárias) e o extrato polar (EP), rico em ACG (9,9 e 9,6 µg/mL dos picos mais intensos), mas sem LST. Os estudos toxicológicos demonstraram que o EP não causou efeitos tóxicos significativos em ratos, enquanto alterações em parâmetros bioquímicos específicos no sangue (creatinina 7,0 mg/dL, glicose 212,0 mg/dL, albumina 2,8 g/dL) de ratos tratados com o EA (10, 50 e 100 mg/kg) e ELF (10 e 100 mg/kg) apontaram para dano renal, confirmado por análises histológicas dos rins. Todos os extratos apresentaram atividade anti-edematogênica in vivo, em especial no modelo de edema induzido por óleo de cróton (EA: 25,9% inibição do edema a 0,5 mg/orelha; EP: 42,7% de inibição a 0,25 mg/orelha, ELF: 44,1% de inibição a 0,25 mg/orelha). O ELF demonstrou os melhores resultados na inibição da migração de neutrófilos, na indução da IL-10, na inibição do NO, TNF-α e PGE₂, quando comparado aos demais extratos. Todos os extratos inibiram de forma estatisticamente similar a atividade da α-amilase, enquanto o EA e o EP foram mais eficazes na redução dos níveis glicêmicos após a administração oral de glicose (controle glicêmico: 201,8±5,2, EA: 169,0±4,9, EP: 176,7,3±7,3, ELF: 219,1±7,6 mg/dL). Com os dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que o consumo do chá das folhas do yacón por períodos prolongados pode ser tóxico e seu uso não deve ser recomendado na medicina popular. As LST parecem ser as substâncias responsáveis por essa toxicidade. Tanto as LST, quanto os ACG contribuem para atividade anti-inflamatória, embora as LST parecem ter efeitos mais pronunciados. Contudo, a atividade anti-diabética da espécie parece estar relacionada principalmente à presença ao ACG e não à LST, sendo necessários estudos mais detalhados com ACG puros para verificar seu uso potencial no tratamento do diabetes.

Palavras-chave: *Smallanthus sonchifolius*, yacón, lactonas sesquiterpênicas, ácido clorogênico, ácido cafeico, diabetes, inflamação, toxicologia.

ABSTRACT

OLIVEIRA, R. B. Anti-diabetic, anti-inflammatory activities, and toxicology of *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson - Asteraceae. 2011. 76 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae), known as yacón is a herb used in folk medicine to treat diabetes. The hypoglycaemic effect of the aqueous extract from yacón leaves was demonstrated in recent studies in diabetic animal models. Phytochemical analyzes have demonstrated that this species is rich in chorogenic acids (CGAs) and sesquiterpene lactones (STLs). Both classes of compounds have many biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and inhibit enzymes that can contribute in the improvement of the diabetic state. However, it is not yet established whether the biological activities of this species are due to the action of the CGAs or STLs. In addition, toxicological analysis of the consumption of yacón leaves has not yet been performed. Thus, the purpose of this study was to evaluate three extracts prepared from leaves of yacón, with the aim to analyze the role of different chemical classes in the development of the biological activities described for this species, as well as their potential toxic effects. The following extracts were obtained: aqueous extract (AE), were detected CGAs (2.0 and 1.3 mg / mL of the more intense peaks), and STLs (99.7 and 319 mg / mL of most intense peaks); leaf rinse extract (LRE), rich in STLs (1257.4 and 1997.7 mg / mL of major peaks), and the polar extract (PE) rich in CGAs (9.9 and 9.6 mg / mL of the more intense peaks), but without STLs. The toxicological studies in animals showed that the PE did not cause significant toxic effects, while changes in specific biochemical parameters in blood (creatinine 7.0 mg / dL, glucose 212.0 mg / dL, albumin 2.8 g / dL) of rats treated with AE (10, 50 and 100 mg / kg) and LRE (10 and 100 mg / kg) indicated kidney damage, which was confirmed by histological analysis of kidneys. All extracts showed anti-oedematogenics activity in vivo, particularly in the model of oedema induced by croton oil (AE: 25.9% of oedema inhibition at 0.5 mg / ear, PE: 42.7% of inhibition at 0.25 mg / ear, LRE: 44.1% inhibition at 0.25 mg / ear). The LRE showed the best results in the inhibition of neutrophil migration, induction of IL-10, as well as NO, TNFα and PGE₂ inhibition, when compared to other extracts. All extracts inhibited in a statistically similar way the activity of α-amylase, while the AE and the PE were more effective in reducing blood glucose levels after oral glucose adminstration (glycaemic control: 201.8 ± 5.2 ; AE: 169, 0 ± 4.9 ; PE: $7.3 \pm 176,7,3$; LRE: 219.1 ± 7.6 mg / dL). The data obtained in this work suggested that the consumption of tea from yacón leaves for prolonged periods can be toxic and their use should not be recommended in folk medicine. The STLs seem to be the substances responsible for this toxicity. Both STLs and CGAs contribute to the anti-inflammatory activity, although the STLs seem to have more pronounced effects. However, the anti-diabetic activity of the yacón leaves seems to be related to the presence of the CGAs and not to LST. More detailed studies with pure CGAs are required in order to determine their potential use in treatment of diabetes.

Keywords: *Smallanthus sonchifolius*, yacón, sesquiterpene lactones, chlorogenic acids, caffeic acids, diabetes, inflammation, toxicology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Rizóforos do yacón utilizados para a produção de mudas	5
Figura 2. Preparação dos extratos de yacón	7
Figura 3. Lavagem das folhas do yacón para a obtenção do extrato do ELF	7
Figura 4. Ensaio de edema de pata induzido por carragenina1	4
Figura 5. Ensaio do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton1	6
Figura 6. Medida dos valores glicêmicos utilizando o aparelho Accu-check® Active2	1
Figura 7. A. Mudas de yacón após 60 dias do plantio dos rizóforos2	2
Figura 8. Espectros na região do IV dos extratos das folhas do yacón2	4
Figura 9. Cromatogramas dos extratos das folhas do yacón obtidos em CLAE-UV-DAD2	6
Figura 10. Exemplos de espectros na região do UV predominantes nos extratos das folhas do	
yacón2	6
Figura 11. Efeitos da administração oral dos extratos dos yacón sobre parâmetros bioquímicos	
sanguíneos em ratos3	7
Figura 12. Cortes longitudinais da região do córtex renal dos animais no ensaio de toxicidade	
em regime de dose repetida3	9
Figura 13. Cortes longitudinais da região da medula renal dos animais no ensaio de toxicidade	
em regime de dose repetida4	0
Figura 14. Efeito anti-edematogênico dos extratos das folhas do yacón no ensaio de edema de	
pata induzido pela carragenina4	.3
Figura 15. Efeito necrótico na cauda dos animais no ensaio de edema de pata induzido pela	
carragenina4	4
Figura 16. Dosagem do NO em culturas de células RAW 264.7 induzidas com LPS após o	
tratamento com os diferentes extratos4	8
Figura 17. Dosagem do fator de necrose de tumor TNF-α em culturas de células RAW 264.7	
induzidas com LPS após o tratamento com os diferentes extratos4	9
Figura 18. Dosagem da PGE ₂ em culturas de células RAW 264.7 induzidas com LPS após o	
tratamento com os diferentes extratos5	0
Figura 19. Porcentagem de inibição da α-amilase em relação ao controle de máxima atividade	
da enzima5	2
Figura 20. Modelos de inflamação5	8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de eluição utilizado na cromatografia líquida a vácuo9
Tabela 2. Concentrações (µg/mL) dos picos identificados nos extratos obtidas através de
curva analítica em CLAE-UV-DAD
Tabela 3. Peso do corpo e proporção do peso dos órgãos em relação ao peso corporal dos
animais tratados comparados aos do grupo controle
Tabela 4. Contagens total e diferencial de leucócitos dos animais que receberam os diferentes
tratamentos com os extatos do yacón, comparado ao grupo controle
Tabela 5. Efeito dos extratos das folhas do yacón sobre o edema de pata induzido por
carragenina
Tabela 6. Resultados obtidos no ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton46
Tabela 7. Efeito dos diferentes extratos das folhas do yacón sobre os níveis de glicose
(mg/dL) em jejum em camundongos normais

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA ácido araquidônico

ACG derivados dos ácidos clorogênicos

AcOEt acetato de etila
AcOH Ácido acético

ANOVA análise de variância

CCD cromatografia em camada delgada

CLV cromatografia líquida à vácuo

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

COX ciclooxigenanse

DMSO dimetilsulfóxido

EA extrato aquoso

ELF extrato de lavagem foliar

EP extrato polar

E.P.M. erro padrão da média

EtOH etanol

IL interleucinaIV infravermelho

LPS lipopolissacaríedeo da membrana plasmática da *Echeria coli*

LST lactonas sesquiterpênicas

MeOH metanol

NO óxido nítrico MeCN acetonitrila

 $\begin{array}{ll} MPO & mieloperoxidase \\ PGE_2 & prostaglandina \ E_2 \end{array}$

TNF- α fator de necrose de tumor α

TPA 13-acetato de tetradecanoilforbol

UV ultravioleta

Sumário

RESUMO	
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ν
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
2.1. Geral Err	o! Indicador não definido.
2.2. Específicos Err	o! Indicador não definido.
3. Material e métodos	5
3.1. Cultivo do yacón	5
3.2. Preparação dos extratos	5
3.3. Análise fitoquímica dos extratos	8
3.3.1. Análise do perfil químico dos extratos	8
3.3.2. Isolamento de constituintes químicos	8
3.3.3. Quantificação das principais classes de compostos químicos presentes	nos extratos 10
3.4. Animais	10
3.5. Ensaio de toxicidade de dose repetida	11
3.6. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	13
3.6.1. Ensaio de edema de pata induzido por carragenina	13
3.6.2. Ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton	15
3.7. Avaliação de atividade anti-inflamatória in vitro	18
3.7.1. Cultura de células	18
3.7.2. Ensaio de viabilidade celular	18
3.7.3. Quantificação do óxido nítrico (NO), TNF-α e PGE ₂	19
3.8. Ensaios de atividade anti-diabética	20
3.8.1. Ensaio <i>in vitro</i> de inibição da α-amilase	20
3.8.2. Teste de tolerância oral à glicose em ratos normais	20
4. Resultados	22
4.1. Cultivo do yacón	22
4.2. Análise fitoquímica dos extratos	23
4.2.1. Isolamento de constituintes químicos	27

4.2.2. Quantificação de substâncias das principais classes químicas presentes nos extratos
4.3. Ensaio de toxicidade de dose repetida
4.3.1. Sinais clínicos
4.3.2. Peso do corpo e órgãos, consumo de água e alimento
4.3.3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos
4.3.4. Necrópsias e análises histopatológicas
4.4. Ensaio da atividade anti-inflamatória in vivo
4.4.1. Ensaio de edema de pata induzido por carragenina
4.4.2. Ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton
4.5. Atividade anti-inflamatória <i>in vitro</i>
4.6. Atividade anti-diabética
4.6.1. Ensaio de inibição da α-amilase <i>in vitro</i>
4.6.2. Teste de intolerância oral à glicose
5. Discussão
6. Conclusão
7. Referências bibliográficas 65
ANEXO I

_______Introdução

1

1. Introdução

Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson (sinonímia botânica Polymnia sonchifolia Poepp. & Endl.) é uma erva perene pertencente à família Asteraceae (tribo Heliantheae, subtribo Melampodiinae). A planta é conhecida popularmente como yacón, sendo originária da região dos Andes, onde as raízes tuberosas são utilizadas como alimento e as folhas no tratamento da hiperglicemia, problemas dos rins e no rejuvenescimento da pele (Valentová et al., 2004). As raízes tuberosas da planta são ricas em oligofrutanos do tipo inulina que conferem à planta propriedades dietéticas e pré-bióticas (Goto et al., 1995; Pedreschi et al., 2003; Genta et al., 2005). Por esse motivo, o cultivo da espécie tem se expandido nas últimas décadas para vários países, tais como Japão, Nova Zelândia, República Tcheca e Brasil (Genta et al., 2005). O yacón foi introduzido no Brasil em 1989 por imigrantes japoneses que utilizavam as folhas no tratamento do diabetes e no controle de altas taxas de colesterol (Vilhena et al., 2000). Atualmente, o yacón é cultivado principalmente na região de Capão Bonito (SP) para fins comerciais (Vilhena et al., 2000), podendo-se encontrar suas raízes tuberosas à venda em feiras livres e em alguns supermercados, enquanto as folhas secas podem ser encontradas em casas de ervas e de produtos naturais.

A ação hiploglicêmica de diferentes extratos das folhas de *S. sonchifolius* foi analisada em ratos normais e com diabetes induzida por estreptozotocina (Aybar *et al.*, 2001; Baroni *et al.*, 2008; Genta *et al.*, 2010), e em camundongos com diabetes geneticamente induzida (Miura *et al.*, 2004; 2007). Nesses estudos, a administração de extratos polares produziu efeito hipoglicêmico significante, com um quadro de melhora geral nos parâmetros corporais dos animais diabéticos. Estudos subsequentes de frações orgânicas do extrato foliar demonstraram que a planta possui atividade antioxidante *in vitro* e reduz a produção de glicose em hepatócitos de ratos (Valentová *et al.*, 2005). Tal atividade antioxidante confere propriedade citoprotetora pelo yacón, o que pode contribuir para sua ação benéfica no tratamento de doenças que envolvem estresse oxidativo, como é o caso do diabetes melito (Valentová & Ulrichová 2003; Valentová *et al.*, 2004; 2005). Essa ação antioxidante tem sido atribuída à alta concentração de ácidos fenólicos, tais como os ácidos clorogênico e cafeico presentes nas folhas (Yan *et al.*, 1999; Simonovska *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2003; Valentová *et al.*, 2003; Diversos compostos derivados do ácido clorogênico

(ACG) foram descritos nas folhas e raízes do yacón, tais como os ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico, 2,3,5-tricafeoilaltrárico e 2,4,5-tricafeoilaltrárico (Takenaka *et al.*, 2003; Terada *et al.*, 2009). Os dois derivados do ácido altrárico isolados das folhas do yacón apresentaram potente inibição da enzima α-glucosidase, tendo sido depositada uma patente com o uso dessas substâncias como potenciais hipoglicemiantes orais (Terada *et al.*, 2009).

Adicionalmente, vários estudos têm demonstrado que a planta possui, ainda, promissoras atividades antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória (Inoue 1995; Pinto *et al.*, 2001; Gonçalez *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Pak *et al.*, 2006; Schorr *et al.*, 2007). Essas atividades parecem estar relacionadas principalmente à presença de lactonas sesquiterpênicas (LST) (Lin *et al.*, 2003; Pak *et al.*, 2006), as quais estão presentes em grandes quantidades nas folhas, sendo consideradas as substâncias majoritárias nesses órgãos (Inoue *et al.*, 1995; Schorr & Da Costa, 2003).

As LST são metabólitos secundários vegetais encontrados predominantemente na família Asteraceae, estando localizadas principalmente nos tricomas glandulares que cobrem os caules, as folhas e inflorescências das espécies. Muitas plantas ricas em LST são reconhecidamente tóxicas, mas, ao mesmo tempo, são amplamente empregadas na medicina popular devido às várias atividades biológicas que possuem (Schmidt, 1999). O melhor exemplo dessa ambigüidade é a espécie *Arnica montana* L., rica em LST e cuja ingestão pode causar problemas gastrintestinais e cardíacos, enquanto preparados das flores são empregados topicamente por suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e anti-séptica (Merfort, 2003).

Dentre as LST isoladas das folhas do yacón, a enidrina, a uvedalina, a sonchifolina e a polimatina B são as mais citadas na literatura (Inoue *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 2003; Schorr & Da Costa 2003; Schorr & Da Costa, 2005). A enidrina é o componente principal encontrado em espécimes cultivados no Brasil e ocorre nos tricomas glandulares das folhas, tendo sido quantificada recentemente (Schorr & Da Costa, 2005). Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório (Schorr *et al.*, 2007) foram isoladas, além dessas, seis outras LST do tipo melampolido do extrato de lavagem das folhas do yacón, sendo que duas delas foram isoladas pela primeira vez da espécie. Todas essas substâncias foram detectadas nos tricomas glandulares foliares. Nesse mesmo trabalho, a uvedalina teve sua atividade anti-inflamatória testada *in vitro*, apresentando forte atividade inibitória do fator de transcrição NF-κB, um regulador central da transcrição de genes relacionados ao processo inflamatório, tais como os genes para a transcrição de citocinas e de moléculas de adesão celular (Ghosh *et al.*, 1998). Os

resultados desse trabalho estão de acordo com a literatura que atribui, pelo menos em parte, a ação anti-inflamatória das LST a sua capacidade de inibir o fator de transcrição NF-κB (Grassl *et al.*, 2005). A LST enidrina já havia tido sua ação comprovada na inibição do NF-κB (Siedle *et al.*, 2004).

Assim, verifica-se que as folhas do yacón são ricas em duas classes principais de substâncias: LST e ACG. Ambas as classes possuem diferentes atividades biológicas descritas na literatura. Contudo, poucos estudos tentaram relacionar essas classes com as diferentes atividades biológicas descritas para o yacón. Portanto, o objetivo desse trabalho foi analisar comparativamente as atividades anti-diabética, anti-inflamatória e tóxica de três diferentes extratos obtidos a partir das folhas do yacón, na tentativa de verificar quais classes de substâncias são responsáveis pelas referidas atividades biológicas descritas para a espécie.

2. Objetivo

Analisar comparativamente as atividades anti-diabética, anti-inflamatória e tóxica de três diferentes extratos obtidos a partir das folhas do yacón (*Samallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson), na tentativa de verificar quais classes de substâncias são responsáveis pelas referidas atividades biológicas descritas para a espécie.

2. Material e métodos

2.1. Plantio do yacón

O plantio do yacón foi realizado a partir de rizóforos (Figura 1A) de plantas adultas (Figura 1B) coletados em Jurucê, distrito de Jardinópolis, SP. A coleta dos rizóforos foi realizada em julho de 2007. Cerca de 150 rizóforos foram plantados inicialmente em sacos de mudas de 10 x 20 cm e regados diariamente. Ao atingir a altura de 15 cm, as mudas foram transferidas para o solo na área do horto do *campus*. Foi adotado o espaçamento de 1,0 m entre linhas e 0,90 m entre plantas, a uma profundidade de aproximadamente 0,15 m.





1

Figura 1. A. Rizóforos do yacón utilizados para a produção de mudas. B. Aspecto vegetativo de indivíduos adultos do yacón (*S. sonchifolius*) na área de coleta em Jurucê, distrito do município de Jardinópolis-SP.

3.2. Preparação dos extratos

Após a coleta, folhas inteiras foram secas em estufa de ar circulante a 40 °C. Foram preparados três extratos liofilizados a partir das folhas secas: um extrato aquoso (EA), um extrato de lavagem foliar (ELF) e um extrato polar (EP). O EA foi preparado na forma de infuso com folhas secas (20 g) em água fervente (1000 mL). Esse passo foi repetido 24 vezes para um total de 500 g de folhas (Figura 2A). A extração foi mantida por 20 min até o extrato alcançar a temperatura ambiente (*c.a.* 26 °C). O extrato foi filtrado, liofilizado e mantido a -20 °C até o momento do uso (o rendimento foi de 1,8 g para cada porção de 20 g de folhas secas, totalizando 45 g de extrato). Extratos preparados na forma de infuso são a maneira usual de consumo de folhas de plantas medicinais pela população, incluindo o yacón.

O ELF foi preparado com folhas secas (1 kg) lavadas rapidamente em acetona (Figura 2B e Figura 3). O objetivo foi extrair o conteúdo glandular (rico em LST) da superfície foliar. Cada folha intacta foi lavada individualmente em acetona por cerca de 20 s com a superfície abaxial virada para baixo (onde os tricomas estão localizados). A extração do conteúdo glandular foi monitorada em estereomicroscópio (Stemi 2000C, Carl Zeiss, Alemanha). O extrato foi então filtrado e evaporado sob vácuo. Esse extrato (26,9 g) foi ressuspendido em MeOH:H₂O (7:3, v/v) e submetido à partição líquido-líquido com *n*-hexano para remover o material graxo. A fração hidrometanólica foi evaporada sob vácuo, liofilizada e mantida a -20 °C até o momento do uso.

O EP foi preparado com as folhas lavadas resultantes da preparação do ELF (Figura 2C). As folhas lavadas foram secas em estufa de ar-circulante e pulverizadas. A extração foi realizada por maceração em MeOH 70% (3 x 24 h). O extrato foi filtrado, o solvente foi evaporado e a amostra foi submetida a uma partição líquido-líquido com *n*-hexano para remover o material graxo. A fração hidrometanólica (95 g) foi seca sob o vácuo, liofilizada e mantida a -20°C até o momento do uso.

Para todos os extratos foram utilizados solventes em grau analítico da marca Synth (Brasil).

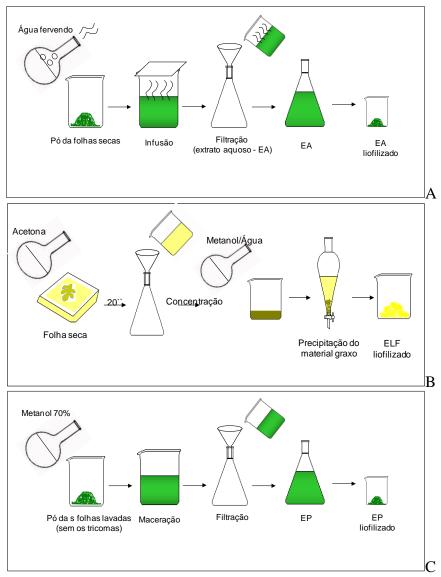


Figura 2. Preparo dos extratos de yacón. A. Extrato aquoso (EA). B. Extrato de lavagem foliar (ELF). C. Extrato polar (EP) livre de tricomas.



Figura 3. Lavagem das folhas do yacón para a obtenção do extrato de lavagem foliar (ELF).

3.3. Análise fitoquímica dos extratos

3.3.1. Análise do perfil químico dos extratos

As análises dos extratos foram realizadas por espectroscopia no infravermelho (IV) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa. A presença de algumas classes de metabólitos secundários (LST, flavonóides ou ACG) foi inferida através de seus espectros no UV obtidos por CLAE, bem como por comparações dos tempos de retenção com padrões autênticos adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Alemanha) ou disponíveis na biblioteca de substâncias do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP-USP (Gobbo-Neto & Lopes, 2008; Schorr & Da Costa, 2005; Schorr *et al.*, 2007).

As análises em CLAE foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão) SCL 10 Avp com detector UV-DAD Shimadzu SPD-M10Avp. O gradiente de eluição consistiu de uma fase móvel binária composta de H₂O (0.5% AcOH) e MeCN (0.5% AcOH) em um gradiente linear de 0 a 45% de MeCN em 30 min. A eluição isocrática ocorreu com 45% de MeCN de 30 – 50 min e um gradiente linear foi utilizado de 45 a 100% de MeCN de 50 – 80 min. O fluxo foi de 1,3 mL/min usando uma coluna C-18 (Shimadzu, ODS Shimpack, 5 μm, 4,6 x 250 mm) e o volume injetado foi de 20 μL. Os dados no UV foram adquiridos entre 190 – 600 nm e os cromatogramas foram registrados em 254 e 325 nm simultaneamente. Os dados cromatográficos foram processados utilizando o software Class VP (versão 5.02; Shimadzu, Japão). Todos os solventes utilizados foram grau HPLC (J.T. Baker, EUA)

3.3.2. Isolamento de constituintes químicos

O ELF foi solubilizado em quantidade suficiente de MeOH/H₂O e submetido a partições líquido-líquido com *n*-hexano e AcOEt, originando-se três frações: hidrometanólica, *n*-hexânica e AcOEt. As frações tiveram seus solventes evaporados e armazenados a -20 °C. Parte da fração obtida em AcOEt foi submetida a uma cromatografia líquida a vácuo (CLV).

Foram utilizados 50 g de sílica 60 H (0,040-0,063 mm, Merck, Brasil) e 2 g da amostra em uma coluna de vidro (5 cm de diâmetro) com placa sinterizada acoplada a uma

bomba a vácuo. A altura da sílica atingiu 5 cm de altura. A amostra foi eluída em sistema de gradiente de fase móvel *n*-hexano/AcOEt, conforme descrito na Tabela 1.

Frações	Eluentes	Proporção dos solventes	Volume coletado
1	<i>n</i> -Hexano	100%	250 mL
2	n-Hexano/AcOEt	7:3	250 mL
3	<i>n</i> -Hexano/AcOEt	1:1	250 mL
4	n-Hexano/AcOEt	3:7	250 mL
5	AcOEt	100%	250 mL
6	AcOEt/MeOH	7:3	250 mL
7	AcOEt/MeOH	1:1	250 mL
8	AcOEt/MeOH	3:7	250 mL
9	МеОН	100%	250 mL

Tabela 1. Sistema de eluição utilizado na cromatografia líquida a vácuo

Todas as frações coletadas foram rotaevaporadas e submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) com sílica gel GF₂₅₄ (0,015 mm; Merck, Brasil). A fase móvel foi *n*-hexano/AcOEt 1:1 e 1 % de ácido acético e, conforme a necessidade, teve sua polaridade aumentada assim como a sua seletividade. As CCDs foram observadas sob luz UV a 254 e 366 nm e posteriormente reveladas através de nebulização com solução vanilina/ácido sulfúrico, seguido de aquecimento.

A fração 3 apresentou-se como um sólido branco em forma de cristais. Essa fração foi submetida a várias CCDs, e a resolução das manchas foi obtida em fase móvel *n*-Hexano/AcOEt 1:1. A fração 3 foi, portanto, submetida a uma coluna *flash* com essa fase móvel em sistema isocrático. A cromatografia *flash*, baseada no trabalho de Still *et al.* (1978), foi realizada em coluna de vidro de 2 cm Ø x 30 cm acoplada a um sistema de pressão com 17 g de sílica gel 60 H (0,040 – 0,063 mm; Merck, Brasil). A altura da camada de sílica atingiu 14 cm de altura. O fluxo de eluição foi de 5 cm/min, ajustado com *n*-hexano, antes que a amostra fosse aplicada. Após o sistema estar montado, a fração 3 foi incorporada em quantidade suficiente de sílica gel 60 H (0,2 – 0,5 mm; Merck, Brasil) e aplicada homogeneamente sobre a camada de sílica. Acima da amostra ainda foi colocado mais 1 cm de sílica gel 60 H (0,2 – 0,5 mm; Merck, Brasil), resultando em 10 frações, as quais foram submetidas à análise por CCD com fase móvel *n*-hexano/AcOEt 1:1. Dessa coluna foram obtidas frações ricas em enidrina e em uvedalina, as quais tiveram suas purificações finais

realizadas em CLAE semi-preparativo em coluna C-18 (Shimadzu, ODS Shim-pack, 5 µm, 20 mm x 25 cm), em cromatógrafo semi-preparativo Shimadzu, modelo Proeminence, com controlador do modelo CBM-20 A, detector UV/Visível modelo SPD-20 A, duas bombas LC-6 AD e coletor automático do modelo FCR-10 A. O cromatógrafo é acoplado a um computador contendo o software LC-Solution Single instalado. Foi injetado um volume de 1 mL contendo 10 mg da fração diluída na fase inicial em um fluxo de 10 mL/min. O gradiente de eluição consistiu de uma fase móvel binária composta de H₂O e MeCN em gradiente linear de 35 a 100% de MeCN em 30 min, a 254 nm.

O EP foi submetido diretamente ao CLAE semi-preparativo, na mesma coluna C-18, com uma fase binária composta de H₂O (0.5% AcOH) e MeCN (0.5% AcOH) em um gradiente linear de 0 a 45% de MeCN em 35 min, com fluxo de 10 mL/min, a 325 nm. O objetivo foi isolar os dois picos de maior intensidade observados no extrato a 325 nm.

3.3.3. Quantificação das principais classes de compostos químicos presentes nos extratos

A quantificação foi realizada através de CLAE-UV-DAD analítico nas condições descritas no item 3.3.1. A quantificação de LST foi realizada através da curva analítica obtida para a enidrina, a quantificação dos ACG foi obtida através da curva analítica obtida para o ácido clorogênico, enquanto a quantificação dos flavonóides totais foi realizada através da curva analítica obtida para a quercetina. As soluções padrões foram injetadas em triplicata por meio de injetor automático. As concentrações foram obtidas através de diluições seriadas de 31,25 – 0,24 μg/mL para o ácido clorogênico e quercetina, e 2.000 – 15,63 μg/mL para a enidrina, totalizando oito pontos em cada curva.

3.4. Animais

Em todos os ensaios in vivo foram utilizados animais oriundos do Biotério Central da Universidade de são Paulo, campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos a temperatura de 25 ± 2 °C, em ciclo calro-escuro de 12 h, com livre acesso à comida e água. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (Protocolo número: 07.1.636.53.5), segundo as regras do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Todos os ensaios foram padronizados em três experimentos independentes para cada ensaio, utilizando-se um n de três animais em cada experimento e análise estatística nãoparamétrica para a avaliação dos resultados. As variáveis padronizadas foram: horário de realização dos experimentos (para evitar variações nas respostas devido a flutuações cicardianas nos animais), peso dos animais, doses dos extratos, veículos utilizados para a diluição dos extratos, doses de drogas indutoras e dos fármacos de referência utilizados como controles positivos.

Após a padronização, os resultados foram analisados através de estatística paramétrica, utilizando-se ANOVA two-way, seguida do teste de Bonferroni para o ensaio de edema de pata e ANOVA one-way, seguida do teste de Dunnet para os demais ensaios. A normalidade dos dados foi verificada através do teste D'Agostino-Pearson ($\alpha = 0.05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism® 5. 0 (GraphPad Software, EUA).

3.5. Ensaio de toxicidade em regime de dose repetida

Ratos Wistar pesando entre 200 - 250 g foram acondicionados em caixas (três animais do mesmo sexo em cada caixa) e divididos em 13 grupos de seis animais (três fêmeas e três machos) por grupo. Diferentes doses dos extratos foram administradas oralmente por meio gavagem. O grupo controle recebeu apenas o veículo (Cremophor® EL 5% Basf, Alemanha). O volume máximo administrado para cada rato foi 1 mL. Todos os grupos foram tratados diariamente por um período máximo de 90 dias. O peso corporal dos animais e a ingestão de comida foram medidos semanalmente e os animais foram observados para o caso de aparecimento de anormalidades no comportamento durante todo o estudo.

Os dois grupos que receberam as maiores doses foram tratados de maneiras diferentes: os do grupos (A) foram tratados por 90 dias antes da coleta de sangue, enquanto os do grupo (B) foram tratados por 90 dias e monitorados por 14 dias adicionais sem o tratamento com os extratos. Esse procedimento foi realizado para investigar se as alterações hematológicas e bioquímicas causadas pelos extratos eram reversíveis. Todos os outros grupos receberam o tratamento até o dia anterior à coleta de sangue. As doses administradas do EA foram 10, 50, 100 (A) e 100 (B) mg/kg. As doses administradas do ELF e PE foram 10, 100, 1.000 (A) e 1.000 (B) mg/kg.

Para as análises hematológicas e bioquímicas, os animais foram mantidos em jejum por 12 h antes da coleta de sangue. No dia da coleta de sangue, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (Gepec, Brasil) e quetamina (Agener, Brasil) 1:1 v/v a 1 µL/g de peso corporal. O sangue foi coletado por punção cardíaca.

As análises hematológicas foram realizadas através da contagem total e diferencial (%) de leucócitos (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos). Para a contagem total foram adicionados 20 µL de sangue a 380 µL de solução de Turk (Sigma-Aldrich, Alemanha). A contagem total foi realizada em câmara de Neubaeur e expressa em células/mm³. A contagem diferencial foi realizada através de esfregaços sangüíneos corados com o corante panótico rápido (Panotic® solution, Laborclin, Brasil). Foram contadas 100 células em diferentes campos, sendo a contagem expressa em porcentagem de células diferenciadas em relação ao número total de células obtido na contagem total. Ambas as contagens foram realizadas sob micriscópio ótico com aumento de 100 vezes para a contagem total e de 1.000 vezes para a contagem diferencial.

As análises bioquímicas do plasma (glicose) e do soro foram realizadas utilizando um analisador automático (ABBA VP, Abott®, EUA) e kits comerciais para análises bioquímicas (Labtest, Brasil). Foram medidos os seguintes parâmetros bioquímicos: ácido úrico, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), amilase, colesterol, triacilglicerideos, proteínas totais, creatinina e glicose.

Após a coleta de sangue os animais foram eutanasiados por decapitação e necropsias foram realizadas. A posição, forma, tamanho e cor dos órgãos internos (ex. coração, rins, glândulas adrenais, pulmões, estômago, fígado, intestino, bexiga, testículos nos machos, ou ovários nas fêmeas) foram analisados para verificar a presença de lesões. Esses órgãos foram pesados para determinar seus pesos relativos. Pequenas peças dos órgãos foram fixadas em formalina neutra tamponada por 48 h. Os fragmentos dos órgãos foram submetidos a técnicas usuais de preparo de lâminas histológicas. Brevemente, os fragmentos foram desidratados em um grau crescente de EtOH (70, 80, 90, 95% e absoluto), clarificados com xileno e embebidos em parafina. Foram feitos cortes de 7 µm de espessura utilizando um micrótomo manual. Os cortes foram submetidos à coloração hematoxilina-eosina, examinados e fotografados sob microscopia de luz no laboratório de Farmacobotânica da FCFRP/USP com a autorização da Profa. Dra. Simone de Pádua Teixeira.

3.6. Atividade anti-inflamatória in vivo

Para ambos os ensaios foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/C pesando entre 20 - 25 g.

3.6.1. Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

Neste ensaio foi utilizada a metodologia descrita em Winter et al. (1962) com modificações. Foram formados grupos de seis camundongos cada, os quais receberam tratamentos via oral com extratos e veículo (Cremophor® EL 5% Basf, Alemanha), ou apenas veículo (controles), ou indometacina (Sigma-Aldrich, Alemanha) (10 mg/kg) como fármaco de referência. Os extratos foram administrados nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg e a indometacina, na dose de 10 mg/kg, meia hora antes da indução do edema. Optou-se por administrar os extratos antes da indução do edema para que houvesse tempo para que as substâncias dos extratos fossem absorvidas pelo trato gastrointestinal dos animais e se tornassem presentes na circulação sangüínea. Dessa forma, foi possível observar a ação dos extratos desde a primeira hora de indução do edema, visto que os mediadores inflamatórios que atuam na primeira hora do edema induzido pela carragenina são diferentes dos mediadores inflamatórios que atuam em horas subsequentes.

Assim, o edema foi induzido pela injeção intraplantar de 50 µL de carragenina (Sigma-Aldrich, Alemanha) 1% na pata esquerda de camundongos da linhagem Balb/C machos pesando entre 20 - 25 g (Figura 4A). Na pata direita foi injetado o mesmo volume de PBS. Todos os experimentos foram realizados entre 9 e 11 h da manhã. A intensidade do edema foi avaliada como a diferença de volumes entre as patas esquerdas (injetadas com carragenina) e as patas direitas (injetadas com PBS) (Figura 4C). As medidas foram realizadas com um medidor de espessura (Mitutoyo Co, Japão) (Figura 4B) antes da injeção de carragenina e 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h após a indução do edema. Devido à grande sensibilidade do medidor de espessura ao toque do experimentador, foi adotado nesse ensaio o procedimento de experimento cego, no qual o tratamento dos animais e as medidas do edema foram realizados por pessoas distintas, sendo que o responsável pela medição não tinha conhecimento do tratamento administrado nos diferentes grupos dos animais. Esse procedimento diminui o erro causado pela expectativa do experimentador em relação aos tratamentos.

_______Material e Métodos 14







Figura 4. Ensaio de edema de pata. **A**. Injeção de carragenina na pata esquerda. **B**. Medida da pata esquerda com o medidor de espessura. **C**. Diferença de volume entre as patas direita (injetada com PBS) e esquerda (injetada com carragenina) dos animais do grupo controle. A seta indica a pata esquerda.

3.6.2. Ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton

A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada como a inibição do edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Nesse ensaio foi utilizada a metodologia de Tubaro et al. (1985). A inflamação cutânea foi induzida pela aplicação de 20 µL de uma solução de acetona contendo 5% de óleo de cróton (Sigma-Aldrich, Alemanha) na superfície interna da orelha esquerda dos camundongos (n = 6/grupo). A orelha direita permaneceu sem tratamento. Os extratos (0,125, 0,25 e 0,5 mg/orelha) foram dissolvidos em glicerol e aplicados topicamente na superfície interna da orelha esquerda 30 min após a administração do óleo de cróton. A indometacina (0,5 mg/orelha) foi utilizada como droga de referência e os animais controle receberam o óleo de cróton e veículos. Os seguintes veículos foram utilizados: água:glicerol (1:8, v/v) para os EA, EP e seus controles, acetona:glicerol (1:8, v/v) para o ELF, indometacina e seus controles. Seis horas após a aplicação do óleo de cróton, os animais foram eutanasiados em câmara de CO2 e um fragmento de 6 mm de diâmetro foi removido de ambas as orelhas com um punch dermatológico (Figura 5). A resposta edematogênica foi medida como a diferença de peso entre os fragmentos das orelhas tratada e não tratada. A atividade anti-inflamatória foi expressa como a porcentagem da redução do edema entre os grupos tratados e controles. Em seguida, os fragmentos das orelhas foram armazenados a -20 °C em tampão NaEDTA/NaCl (pH 4,7) para posterior dosagem da mieloperoxidase (MPO) e da interleucina-10 (IL-10).





Figura 5. Ensaio do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. **A**. aplicação do óleo de cróton na orelha esquerda de camundongo Balb/C. **B**. Diferença de volume entre as orelhas direita e esquerda (seta) 30 min após a indução do edema. **C**. Aplicação do extrato na orelha esquerda. **D**. e **E**. Retirada do disco de 6 mm da orelha com o auxilio de *punch* dermatológico do animal eutanasiado após 6 h de indução do edema.

3.6.2.1. Dosagem da mieloperoxidase (MPO)

O ensaio cinético-colorimétrico da MPO foi utilizado para avaliar a migração de leucócitos para o tecido subcutâneo da orelha dos camundongos. Este ensaio foi realizado no laboratório da Profa. Dra. Ana Paula Campaneli da FOB-USP, com a ajuda e supervisão da Dra. Thais Helena Gasparoto. Os fragmentos das orelhas esquerdas oriundas do ensaio de edema de orelha com óleo de cróton foram mantidos em 200 µL de tampão NaEDTA/NaCl (pH 4.7) a -20 °C até o momento do experimento. Os fragmentos foram homogeneizados usando um homogeneizador de tecidos (PT03100, Polytron Technologies, Taiwan), centrifugados a 3000 rpm, por 15 min a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 200 µL de tampão HTAB (Brometo de Hexadecilmetilamônio, BD, Brasil) (pH 5,4) e homogeneizado novamente. As amostras foram re-centrifugadas e 20 µL do sobrenadante foi utilizado para a quantificação da MPO. Os 20 μL da amostra foram adicionados a 30 μL de NaHPO₄ 0,08 M. A reação enzimática foi iniciada com a adição do substrato TMB (3,3',5,5'tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ (2,5 M). A absorbância foi medida a 450 nm em um espectrofotômetro (Bio-Rad model 680 – Microplate Reader, EUA) e a atividade da MPO das amostras foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos. Os resultados foram expressos como atividade da MPO (número de neutrófilos x 10⁵/orelha).

3.6.2.2. Dosagem da IL-10

Alícotas dos sobrenadantes resultantes da homogeneização das orelhas com HTAB, descrita no ensaio de quantificação da MPO, foram coletadas e utilizadas na quantificação da produção da IL-10 com um kit de ELISA comercial (Invitrogen, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram comparados a uma curva padrão e expressos como concentração de IL-10 (10⁵ pg/mL).

3.7. Avaliação de atividade anti-inflamatória in vitro

Os protocolos descritos nessa seção foram previamente padronizados no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP, sob a supervisão da Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli.

3.7.1. Cultura de células

Macrófagos murinos da linhagem celular RAW 264.7 foram crescidos a 37 °C e 5% de CO₂ em meio de cultura DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina. As células foram delicadamente raspadas da garrafa de cultura de células, transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas por 10 min a 1.500 rpm em temperatura aproximada de 18 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram re-suspensas em 10 mL de DMEM. A concentração celular foi ajustada para 5 x 10⁵ células/mL. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 24 h para que ocorresse a aderência celular. Após a aderência celular, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura contendo os extratos em diferentes concentrações (0,25, 0,5 e 1,0 µg/mL), ou com os controles positivos indometacina ou dexametasona (1,0 µg/mL) e estimuladas com um lipopolissacarídeo da bactéria Escherichia coli (LPS). As doses utilizadas foram previamente determinadas em ensaio de viabilidade celular descrito a seguir.

3.7.2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células RAW 264.7 foi avaliada em triplicata após 24 h de exposição contínua aos extratos ou drogas de referência e medida através do ensaio MTT colorimétrico de redução do (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolium) a formazan. Nessa técnica, a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis. Após a aderência celular, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura contendo os extratos do yacón diluídos em DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Alemanha), nas seguintes concentrações: 1,0, 0,5 e 0,25 µg/mL. Os controles utilizados foram DMSO e meio de cultura. Após a adição dos extratos, as placas foram incubadas por 24 h e, em seguida, o meio de cultura contendo os extratos foi substituído por outro, sem soro, mas contendo o corante MTT 0,5 mg/mL, previamente filtrado em membrana de 0,22 mm. As células foram incubadas por 4 h, tempo necessário para ocorrer a redução do MTT à formazan. Após esse período, foram adicionados ao meio de cultura 50 µL de SDS 20% - HCl 0,01 M para a solubilização do formazan. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 570 nm e os resultados foram expressos como % de viabilidade celular.

3.7.3. Quantificação do óxido nítrico (NO), TNF-α e PGE₂

Esse ensaio tem como base a estimulação das células com LPS, um polissacarídeo extraído da membrana plasmática da bactéria Escherichia coli. O LPS induz as células a produzir mediadores inflamatórios, tais como citocinas, prostaglandinas e NO. Assim, os extratos são adicionados ao meio de cultura para verificar se são capazes de inibir a produção dos mediadores inflamatórios induzidos pelo LPS.

Para isso, foram utilizadas células da linhagem RAW 264.7. As técnicas de crescimento celular e plaqueamento foram idênticas às descritas no item anterior. Após a aderência celular, o meio de cultura foi retirado das placas e adicionado outro meio de cultura contendo os extratos (1,0, 0,5 e 0,25µg/mL) previamente diluídos em DMSO. As células foram incubadas por 2 h. Após esse período, as células foram estimuladas com LPS em uma concentração de 2 μg/mL e incubadas por 24 h. Em seguida, metade do volume (100 μL) dos sobrenadantes foi retirada e transferida para outra placa de 96 poços para a quantificação do NO e o restante armazenado em freezer a -80 °C para a quantificação do TNF-α e PGE₂.

A quantificação de NO acumulado no meio de cultura foi realizada indiretamente através da determinação da concentração total de nitrito, um produto de oxidação do NO. Triplicatas das alíquotas dos sobrenadantes (100 µL) foram incubadas por 5 min com igual volume do reagente de Griess (1:1 v/v das soluções de H₃PO₄ 5% contendo sulfanilamida 1% e de N-(1-naftil)etilenediamina 1%). A absorvância foi medida a 550 nm e a concentração total de nitrito determinada usando curva padrão de NaNO₂ (Sigma-Aldrich, Alemanha).

O restante dos sobrenadantes do meio de cultura das células RAW 264.7 foi utilizado para a quantificação do TNF-α e da PGE₂ usando kits de ELISA comerciais (Cayman, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram comparados com curvas padrões e expressos em pg/mL.

3.8. Ensaios de atividade anti-diabética

3.8.1. Ensaio *in vitro* de inibição da α-amilase

Para este ensaio foi utilizada a metodologia de Bernfeld (1955) com modificações para a realização em placas de 96 poços. A enzima α-amilase salivar humana (Sigma, cat. A0521-500U, Alemanha) foi diluída em CaCl₂ (10 mM) e aliquotada em tampão fosfato (pH 6,9). Os extratos (25 μL) foram incubados com seis unidades da enzima (25 μL) em tampão fosfato (pH 6,9) por 30 min a 37 °C. A concentração final dos extratos foi de 1 µg/mL. Em seguida, foram adicionados 25 µL de uma solução de amido 0,5% (Sigma-Aldrich, Alemanha) em tampão fosfato (pH 6,9) como substrato. A mistura foi incubada por 30 min a 37 °C. A reação enzimática foi interrompida com 50 µL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, Alemanha) a 1% (diluído em NaOH 1 N e tartarato de sódio e potássio 30%). A placa foi incubada em banho-maria fervente por 15 min. A absorbância foi lida a 540 nm. A acarbose (Sigma-Aldrich, Alemanha) 1µg/mL foi utilizada como controle positivo. Para o controle negativo foi utilizada a enzima incubada com a solução de amido, correspondendo a 100% da atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da atividade enzimática.

3.8.2. Teste de tolerância oral à glicose em camundongos normais

Camundongos machos da linhagem Balb/C (25 – 30g) foram divididos em grupos de seis animais cada e mantidos em jejum por 12 h. Os extratos foram administrados via oral aos animais nas doses de 10 mg/kg. Trinta minutos após a administração dos extratos, os animais receberam uma solução via oral de glicose (1 g/kg). O sangue retirado da cauda dos animais

foi utilizado para medir a glicemia utilizando o aparelho Accu-check® Active (Roche Diagnostics, Alemanha) (Figura 6) nos tempos 0 (antes da administração dos extratos), 30 (antes da administração da glicose), 60, 90 e 120 min após a administração dos extratos. A metformina (10 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. O grupo que serviu como controle negativo recebeu apenas veículo (Cremophor® EL 5% Basf, Alemanha) e glicose.

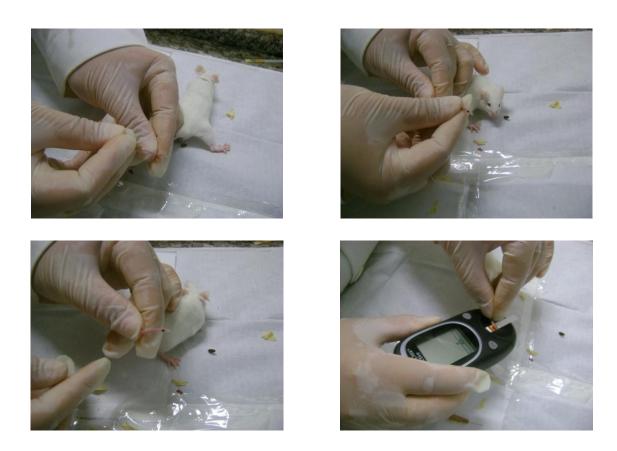


Figura 6. Retirada de sangue das caudas dos animais e medida dos valores glicêmicos utilizando o aparelho Accu-check® Active.

4. Resultados

4.1. Plantio do yacón

Dos 150 rizóforos plantados, 86 brotaram, formando pequenas mudas (Figura 7) que, ao atingirem a altura 15 cm, foram transferidas para o solo. As folhas foram coletadas de indivíduos com 90 dias e ca. 50 cm de altura e secas em estufa de ar circulante para o preparo dos extratos.

Como o yacón é uma planta anual, no mês de junho de 2008 as plantas perderam suas partes aéreas. A parte subterrânea das plantas foi arrancada e os rizóforos foram separados para a produção de novas mudas.

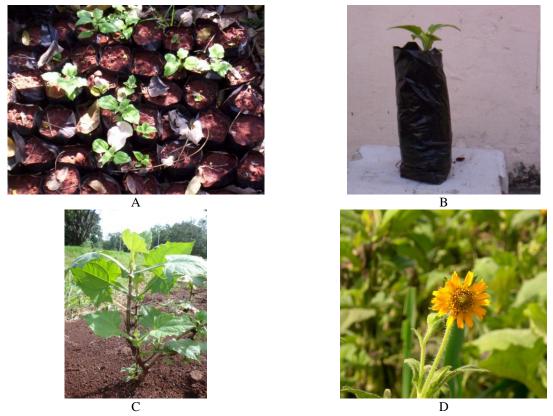


Figura 7. A. Mudas de yacón após 60 dias do plantio dos rizóforos. B. Detalhe mostrando um saco de muda com uma muda de yacón de 60 dias, C. Aspecto vegetativo de um indivíduo após 90 dias do plantio. D. Detalhe da flor do yacón.

4.2. Análise fitoquímica dos extratos

A análise no IV foi realizada com objetivo de verificar se LST estão presentes nos extratos. As LST apresentam bandas devido ao estiramento dos grupos C=O e C-O (Socrates, 1994). No caso das LST, observa-se uma banda intensa típica de estiramento da carbonila da γ-lactona α,β-insaturada em torno de 1760 cm⁻¹. Tal banda é bastante intensa no espectro do ELF (1768 cm⁻¹) conforme esperado (Figura 8C). Os espectros do EA e do EP (Figura 3 A e B, respectivamente) não apresentaram essa banda característica de LST, indicando que tais extratos estão livres de LST, ou que pelo menos estas não estão presentes em grandes quantidades. Os fenóis como os ACG apresentam bandas de estiramento de –OH entre 3400-3230 cm⁻¹. As absorções de C=C de estiramento para esses compostos variam em função dos substituintes e de suas posições (Socrates 1994). O EA e EP apresentam bandas intensas em torno de 1600 cm⁻¹ e 3300 cm⁻¹ (Figura 8 A e B), indicando a presença de compostos fenólicos. Tais bandas eram esperadas, visto que esses extratos são ricos em ACG.

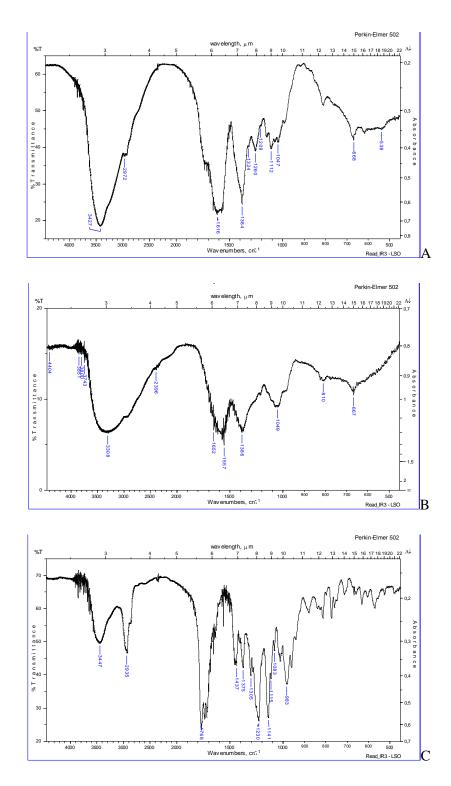


Figura 8. Espectros na região do IV dos extratos das folhas do yacón. A. EA. B. EP. C. ELF.

As análises em CLAE demonstraram a presença de compostos polares no EA e EP e muitos picos com tempos de retenção baixos (Figura 9). As análises dos espectros no UV de cada pico sugeririam que os ACG [UV máx: 298 e 325 nm (Gobbo-Neto and Lopes, 2008)] foram predominantes no EA e EP, incluindo os maiores picos 1 e 4 a 325 nm (Figura 9B e 10). A comparação dos tempos de retenção dos principais picos do EA e do EP com o de padrões autênticos identificaram os picos 2 e 3 como ácido p-cumárico (1) e ácido cafeico (2), respectivamente. O cromatograma do ELF mostrou compostos com tempos de retenção intermediários e, portanto, com polaridade intermediária, sendo a maioria deles visíveis a 254 nm (Figura 9A). O perfil no UV do ELF, bem como a comparação com padrões autênticos, sugeriram a presença de LST [UV máx: 254 nm (Schorr & Da Costa, 2005)] e flavonóides [banda II UV máx: 260-280 nm, banda I UV máx: 320-370 nm (Gobbo-Neto and Lopes, 2008)]. A comparação dos tempos de retenção dos principais picos com o de padrões autênticos disponíveis em nosso laboratório para o ELF identificou o pico 5 como o flavonóide 3-O-metilquercetina (3), o pico 6 como o flavonóide 3,4'-di-O-metilquercetina (4), e os picos 7, 8, 9, 10 e 11 como as LST enidrina (5), uvedalina (6), 8β-angelóxi-germacra-1(10)Z,4E,11(13)-trien- $6\alpha,12$ -olido-14-óico (8), polimatina B (7) e sonchifolina (9), respectivamente. Picos com baixa intensidade e com os mesmos tempos de retenção e perfil no UV da enidrina e uvedalina também foram observados no EA a 254 nm (Figura 9A). A confirmação foi realizada com co-injeção com os padrões autênticos. Foi também possível observar picos coincidentes de LST minoritárias (picos 9, 10 e 11) no EA e ELF a 254 nm (Figura 9A). Assim, as análises em CLAE-UV-DAD sugeriram que o EA e o EP foram ricos em derivados dos ACG e o ELF é constituído principalmente de LST. Embora as LST não tenham sido detectadas no EP, elas foram detectadas em baixas concentrações EA.

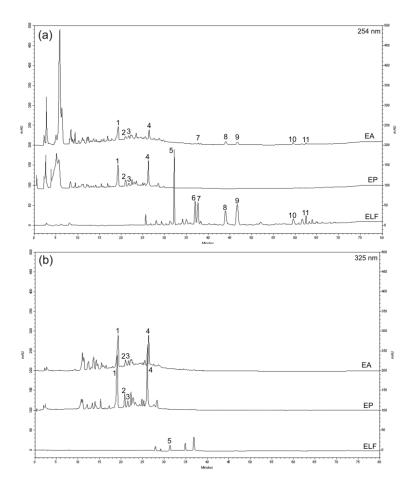


Figura 9. Cromatogramas dos extratos das folhas do yacón obtidos em CLAE-UV-DAD. A. 254 nm e B. 325 nm. O gradiente de eluição consistiu em uma fase móvel binária composta de H₂O (0,5% AcOH) e MeCN (0,5% AcOH) em gradiente linear de 0 a 45% de MeCN em 30 min. A eluição isocrática ocorreu com 45% de MeCN de 30 - 50 min, seguida por um gradiente linear até 100% MeCN de 50 - 80 min. O fluxo utilizado foi 1,3 mL/min usando uma coluna C-18 (Shimadzu, Shimpack 5 µm, 4.6 x 250 mm). O pico 1 é um derivado do ACG (UV max: 298 and 325 nm), 2 é ácido cumárico, 3 é o ácido cafeico, 4 é um derivado do ACG (UV max: 298 and 325 nm), 5 é o flavonóide 3-O-metilquercetina, 6 é o flavonóide 3,4'-di-O-metilquercetina, 7 é a LST enidrina, 8 é a LST uvedalina, 9 é a LST ácido 8βangelóxi-germacra-1(10)Z,4E,11(13)-trien-6α,12-olido-14-óico, 10 é LST polimatina B e 11 é LST sonchifolina.

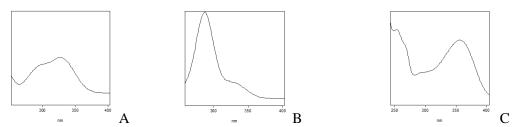


Figura 10. Exemplos de espectros na região do UV predominantes nos extratos das folhas do yacón. A. Exemplo de espectro de ACG. B. Exemplo de espectro de LST. C. Exemplo de espectro de flavonóide.

(8) R = H (9) R = Me

4.2.1. Isolamento de constituintes químicos

As LST enidrina (5) e uvedalina (6) e o flavonóide 3,4'-di-O-metilquercetina (4) foram isolados a partir do ELF. Essas substâncias resultaram da fração 3 da CLV, a qual foi submetida a uma coluna *flash* com fase móvel isocrática (n-Hexano/AcOEt 1:1). A pureza das substâncias foi determinada através de CCD e CLAE. Do EP foram isolados dois ACG, que corresponderam aos picos 1 e 4, picos de maior intensidade a 325 nm, tanto no EP, quanto no EA. Essas substâncias estão em fase de elucidação estrutural, e portanto suas estruturas não serão apresentadas aqui.

Quantificação de substâncias das principais classes químicas presentes nos 4.2.2. extratos

Foram obtidas curvas analíticas para a enidrina ($r^2 = 0.992$), ácido clorogênico ($r^2 = 0.992$), 0,999) e quercetina ($r^2 = 0.996$). As áreas dos picos foram utilizadas para calcular suas respectivas concentrações em cada extrato através das equações obtidas nas curvas analíticas e comparações dos seus espectros no UV a 254 nm. Na Tabela 2 é possível observar que as LST são as substâncias majoritárias no ELF, estando os flavonóides presentes em baixas concentrações. No EA, as LST estão menos concentradas em relação ao ELF, mas estas parecem estar mais concentradas em relação aos ACG. Contudo não é possível afirmar esse fato categoricamente, pois não foram somadas as áreas de todos os picos correspondentes aos ACG devido ao fato de muitos picos terem eluído juntos. Contudo, as concentrações dos ACG no EP são nitidamente maiores do que no EA.

Tabela 2. Concentrações (µg/mL) dos picos identificados nos extratos obtidas através de curva analítica em CLAE-UV-DAD

# Pico	Classe/Composto	EA	EP	ELF
Pico 1	* ACG	2,0	9,9	0,0
Pico 2	Ácido cumárico	0,3	3,5	0,0
Pico 3	Ácido cafeico	0,3	1,3	0,0
Pico 4	*ACG	1,3	9,6	0,0
Pico 5	3-O-metilquercetina	0,0	0,0	20,4
Pico 6	3,4'-di-O-metilquercetina	0,0	0,0	7,2
Pico 7	Enidrina	99,7	0,0	1997,7
Pico 8	Uvedalina	319,0	0,0	1257,4
Pico 9	8β-angelóxi-germacra-1(10) <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,11(13)-trien-6α,12-	126.0	0.0	1007.7
PICO 9	olido-14-óico	136,0	0,0	1997,7
Pico 10	Polimatina B	129,3	0,0	616,2
Pico 11	Sonchifolina	102,7	0,0	519,1

^{*} Estruturas químicas ainda não determinadas.

4.3. Ensaio de toxicidade de dose repetida

4.3.1. Sinais clínicos

Os ratos que receberam o EP não apresentaram sinais comportamentais perceptíveis de toxicidade em nenhuma das doses testadas. O animais que receberam o EA na dose de 100 mg/kg e o ELF nas doses de 10 mg/kg apresentaram hipoatividade e astenia. Os grupos que receberam o EA em doses baixas (10 e 50 mg/kg) não apresentaram sintomas comportamentais de toxicidade. Os ratos tratados com o ELF a 100 mg/kg apresentaram piloereção, astenia, ataxia, anorexia e dificuldade respiratória. Todos os animais do grupo ELF 100 mg/kg morreram na quarta semana de tratamento, não tendo sido possível a coleta de sangue para as análises hematológicas. Assim, um novo grupo que recebeu o ELF a 100 mg/kg foi analisado. O sangue desse novo grupo foi coletado após aparecerem os primeiros sinais de toxicidade (14 dias após o início do tratamento). Os animais de ambos os grupos que receberam o ELF a 1.000 mg/kg (1.000 mg/kg A e 1.000 mg/kg B) apresentaram os mesmos sintomas que os grupos tratados com ELF 100 mg/kg, sendo que todos os animais morreram

entre o segundo e o terceiro dia. Novos grupos de ELF 1.000 mg/kg não foram analisados devido à alta toxicidade do extrato. Todos os animais dos outros grupos foram eutanasiados por decapitação e submetidos a necropsias para análises histopatológicas.

4.3.2. Peso do corpo e órgãos, consumo de água e alimento

Ratos tratados com o EP não apresentaram diferenças em ganho de peso ou consumo de água e alimento quando comparados ao grupo controle (Tabela 3). Ratos dos grupos que receberam o EA e o ELF a 100 mg/kg tiveram um ganho menor de peso quando comparados ao grupo controle (Tabela 3). Esses animais também apresentaram menor ingestão de água e ração.

O peso do timo e do pulmão estavam aumentados nos ratos que receberam o EA, e o peso do fígado estava aumentado nos ratos que receberam 100 mg/kg do ELF (Tabela 3). O peso dos rins estava aumentado nos ratos tratados com EA a 50 e 100 mg/kg, bem como nos ratos tratados com ELF a 100 mg/kg. O baço estava aumentado apenas no grupo que recebeu o EA 100 mg/kg (Tabela 3).

Tabela 3. Peso do corpo e proporção do peso dos órgãos em relação ao peso corporal dos animais tratados comparados aos do grupo controle.

Grupo	Peso do corpo (g)	Timo (%)	Fígado (%)	Baço (%)	Rim (%)
Controle	$303,0 \pm 23,0$	$0,35 \pm 0,06$	$4,63 \pm 0,30$	$0,32 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,03$
EA 10 mg/kg	$299,2 \pm 59,8$	$0,38 \pm 0,08$	$5,\!99 \pm 1,\!08$	$0,53 \pm 0,12$	0.88 ± 0.14
EA 50 mg/kg	$295,8 \pm 65,4$	$0,37 \pm 0,05$	$6,\!92\pm1,\!95$	$0,\!48 \pm 0,\!09$	$1,04 \pm 0,27*$
EA 100 (A) mg/kg	$149.8 \pm 31.1*$	$0,65 \pm 0,24$	$7,99 \pm 1,38$	$0,\!87\pm0,\!27$	$1,39 \pm 0,40*$
EA 100 (B) mg/kg	$177,3 \pm 52,2*$	$1,05 \pm 0,39*$	$7,\!87\pm1,\!03$	$1,09 \pm 0,37*$	$1,68 \pm 0,54*$
EP 10 mg/kg	$328,2 \pm 50,6$	$0,\!25 \pm 0,\!06$	$4,65 \pm 0,81$	$0,35 \pm 0,06$	$0,\!66\pm0,\!10$
EP 100 mg/kg	$310,3 \pm 55,0$	$0,31 \pm 0,04$	$5{,}70 \pm 1{,}08$	$0,43 \pm 0,05$	$0,\!77\pm0,\!10$
EP 1000 (A) mg/kg	$326,7 \pm 39,9$	$0,\!22 \pm 0,\!03$	$4,\!09\pm0,\!53$	$0,33 \pm 0,06$	$0,\!57 \pm 0,\!09$
EP 1000 (B) mg/kg	$333,8 \pm 51,0$	$0,\!27 \pm 0,\!04$	$4,\!01\pm0,\!56$	$0,33 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,09$
ELF 10 mg/kg	$279,3 \pm 30,2$	$0,\!25 \pm 0,\!07$	$4{,}74\pm0{,}67$	$0,37 \pm 0,04$	$0{,}72 \pm 0{,}08$
ELF 100 mg/kg	$154.8 \pm 20.0*$	$0,54 \pm 0,07$	$9,07 \pm 1,60*$	$0,72\pm0,12$	$1,20 \pm 0,24*$

As proporções do peso dos órgãos em relação ao peso corporal foram calculadas como: (peso do órgão/peso terminal do corpo) x 100 e expressas como porcentagem do peso do órgão.

Os valores estão expressos como média \pm E.P.M., n=6. Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett para comparações com o grupo controle. *P<0,05.

- (A) Ratos tratados até um dia antes da coleta de sangue (90 dias de tratamento).
- (B) Ratos foram observados por 14 dias adicionais após 90 dias de tratamento antes da coleta de sangue.

4.3.3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Não foram observadas alterações estatisticamente significativas nos leucócitos em nenhum dos grupos observados. Contudo, a contagem total de leucócitos e diferencial de células mononucleares estavam ligeiramente aumentados nos grupos que receberam o EA e EP (Tabela 4)

Os efeitos da administração oral dos três extratos de todos os parâmetros bioquímicos analisados são apresentados na Figura 11. Todos os extratos causaram alguma alteração nos parâmetros bioquímicos.

Comparando com os animais controle, foram observadas as seguintes alterações nos parâmetros bioquímicos: um aumento significativo nos níveis de glicose sangüínea [EA 10 mg/kg, 50 mg/kg e 100 mg/kg (A)], AST [EA 10 mg/kg e 100 mg/kg (A); ELF 100 mg/kg], triglicérides [EA 50 mg/kg e 100 mg/kg (B)], albumina [EA 100 mg/kg (A) e 100 mg/kg (B); EP 1000 mg/kg (A); ELF 100 mg/kg], proteínas totais [EA 100 mg/kg (A) e 100 mg/kg (B); EP 10 mg/kg, 100 mg/kg, 1000 mg/kg (A) e 1000 mg/kg (B); ELF 10 mg/kg e 100 mg/kg] e creatinina [EA 100 mg/kg (A) e 100 mg/kg (B); EP 1,000 mg/kg (A) e 1,000 mg/kg (B)] (Figura 11)

Tabela 4. Contagens total e diferencial de leucócitos (GB) dos animais que receberam os diferentes tratamentos com os extatos do yacón^a, comparado ao grupo controle.

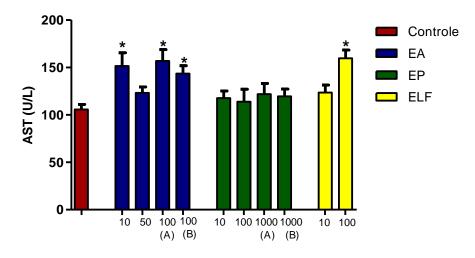
Grupo	$GB (10^3/mL)$	Neutrófilos (%)	Células Mononucleares (%)	Eosinófilos (%)
Controle	$9,47 \pm 1,80$	$32,77 \pm 3,90$	$65,39 \pm 5,55$	$1,84 \pm 1,84$
EA 10 mg/kg	$12,91 \pm 2,08$	$20,\!22 \pm 6,\!78$	$85,19 \pm 6,44$	$1,33 \pm 0,48$
EA 50 mg/kg	$12,07 \pm 1,30$	$14,64 \pm 3,78$	$84,91 \pm 3,84$	$0,45 \pm 0,29$
EA 100 (A) mg/kg	$8,96 \pm 0,46$	$24,38 \pm 5,44$	$73,09 \pm 5,81$	$2,53 \pm 1,19$
EA 100 (B) mg/kg	$8,37 \pm 0,84$	$31,00 \pm 2,00$	$66,41 \pm 2,34$	$2,59 \pm 1,12$
EP 10 mg/kg	$10,03 \pm 0,70$	$18,15 \pm 2,23$	$81,72 \pm 2,23$	$0,13 \pm 0,13$
EP 100 mg/kg	$8,44 \pm 1,05$	$24,18 \pm 5,57$	$74,84 \pm 5,90$	$0,98 \pm 0,65$
EP 1,000 (A) mg/kg	$10,19 \pm 1,39$	$23,63 \pm 5,74$	$75,92 \pm 5,76$	$0,\!45\pm0,\!21$
EP 1,000 (B) mg/kg	$8,38 \pm 1,69$	$50,72 \pm 14,24$	$48,60 \pm 14,40$	$0,\!54\pm0,\!40$
ELF 10 mg/kg	$9,10 \pm 1,05$	$36,03 \pm 7,68$	$63,84 \pm 7,65$	$0,13 \pm 0,13$
ELF 100 mg/kg	$10,\!88 \pm 0,\!97$	$16,46 \pm 4,11$	$82,55 \pm 4,27$	$0,99 \pm 0,26$

Os valores estão expressos como média \pm E.P.M., n=6. Os resultados experimentais dos diferentes tratamentos foram analisados usando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett para comparações com o grupo controle.

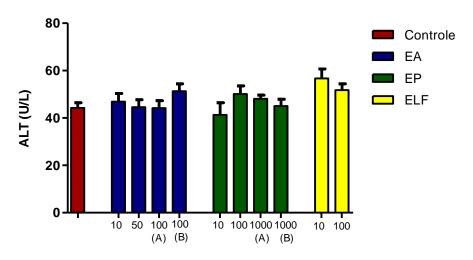
⁽A) Ratos tratados até um dia antes da coleta de sangue (90 dias de tratamento).

⁽B) Ratos foram observados por 14 dias adicionais após 90 dias de tratamento antes da coleta de sangue.

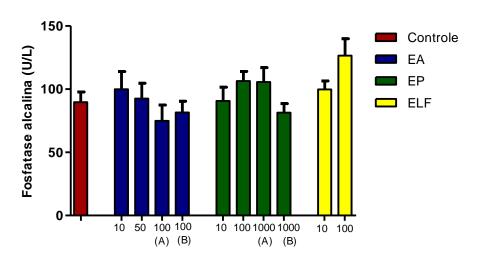
^aOs basófilos foram contados, mas o valor foi zero em todas as doses e extratos.



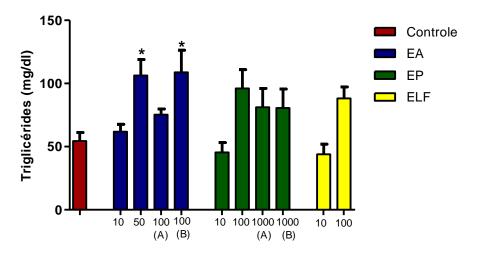
Dose (mg/kg)



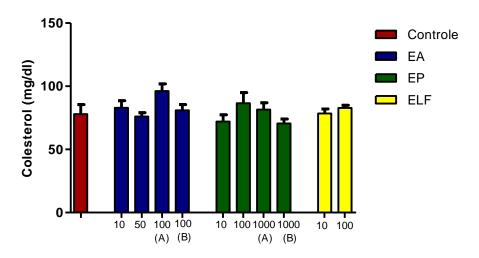
Dose (mg/kg)



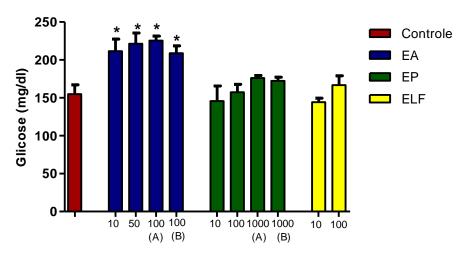
Dose (mg/kg)



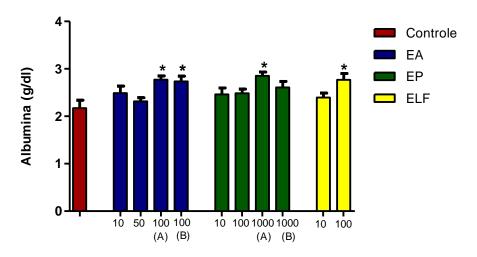
Dose (mg/kg)



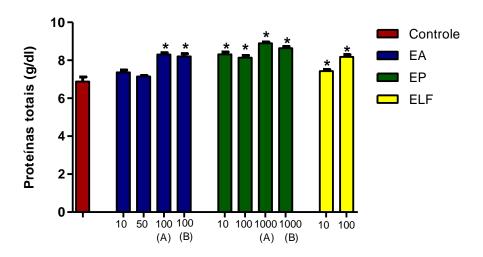
Dose (mg/kg)



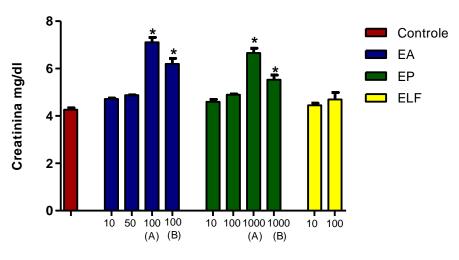
Dose (mg/kg)



Dose (mg/kg)



Dose (mg/kg)



Dose (mg/kg)

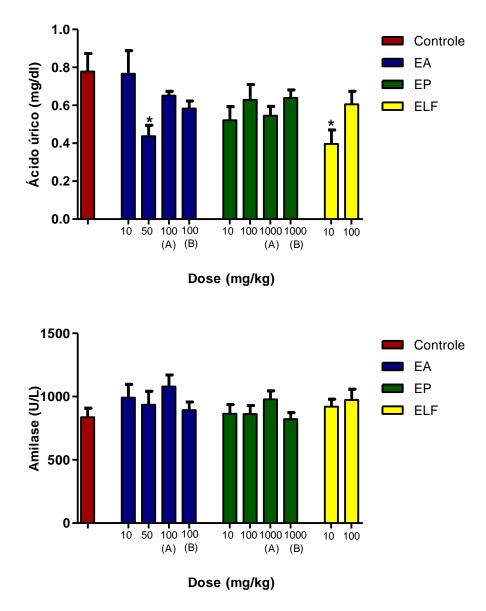


Figura 11. Efeitos da administração oral dos extratos dos yacón sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos em ratos. Os dados estão expressos como media \pm E.P.M. *P \leq 0,05 comparado ao controle (ANOVA *one-way*, seguida pelo teste de Dunnet).

4.3.4. Necrópsias e análises histopatológicas

Os resultados das análises bioquímicas apontaram para dano renal nos animais dos grupos que receberam o EA e o ELF. Assim, foram confeccionadas lâminas histológicas dos rins para análise das possíveis alterações.

As características dos rins dos animais controle mostraram estruturas normais (Figura 12A e B, Figura 13A e B). Não foram observados danos nos rins dos animais que receberam o EP em baixas doses (10 e100 mg/kg), estando os glomérulos, túbulos distais e proximais com aparência normal. Contudo, foi observada uma reação inflamatória com células polimorfonucleares nos animais que receberam o EP a 1.000 mg/kg.

Nos rins dos animais tratados com o EA a 100 mg/kg, foi observado um grande influxo de células na região cortical, principalmente próximo aos glomérulos, bem como na região medular (Figura 12C e D). A morfologia do glomérulo estava alterada nesse grupo. Foram observadas alterações nas células mesanginais e o espaço urinário estava aumentado, o que pode ser um provável resultado da perda de glomérulos. Os glomérulos remanescentes aumentam sua capacidade de filtração para tentar manter uma taxa normal de filtração.

Nos rins dos ratos tratados com o ELF a 100 mg/kg, foram observadas alterações nos glomérulos, bem como nos túbulos distal e proximal e medula (Figura 12E e F, Figura 13E e F). O glomérulo apresentou atrofia e degeneração da matriz mesanginal. Foi observado material amorfo depositado no interior dos túbulos. Adicionalmente, foi observada uma diminuição da afinidade pela coloração com a eosina. Como a eosina posui afinidade para compostos ácidos no citoplasma, essa diminuição da coloração sugere que o depósito de material amorfo tenha características básicas.

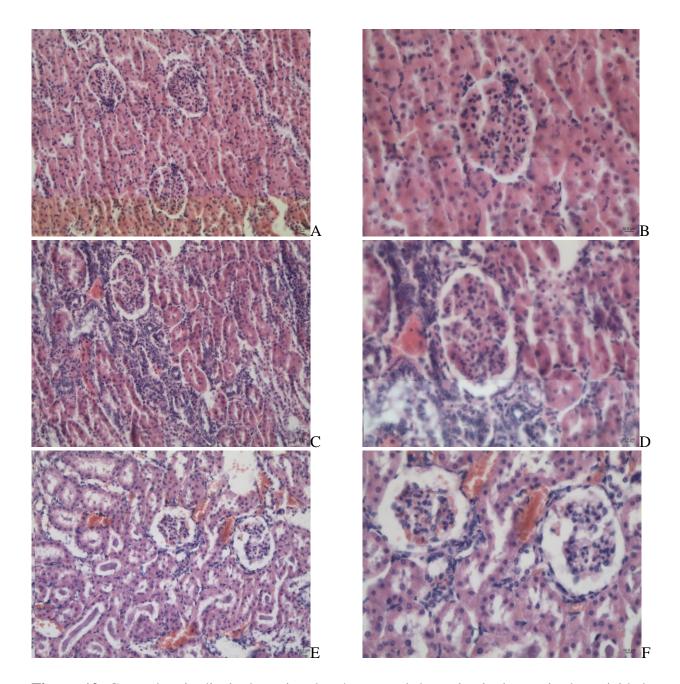


Figura 12. Cortes longitudinais da região do córtex renal dos animais do ensaio de toxicidade em regime de dose repetida. A. Córtex do rim de animal do grupo controle evidenciando-se três glomérulos e os túbulos contorcidos (20X). B. Glomérulo de animal do grupo controle (40X). C. Córtex do rim de animal do EA 100 mg/kg evidenciando-se glomérulo e os túbulos contorcidos (20X) Verifica-se quantidade anormal de núcleos. D. Detalhe do mesmo glomérulo (40X). E. Córtex do rim de animal do ELF 100 mg/kg evidenciando-se glomérulos degenerados e os túbulos contorcidos com depósito de substância amorfa (20X). F. Detalhe da mesma região em 40 X.

Resultados 40

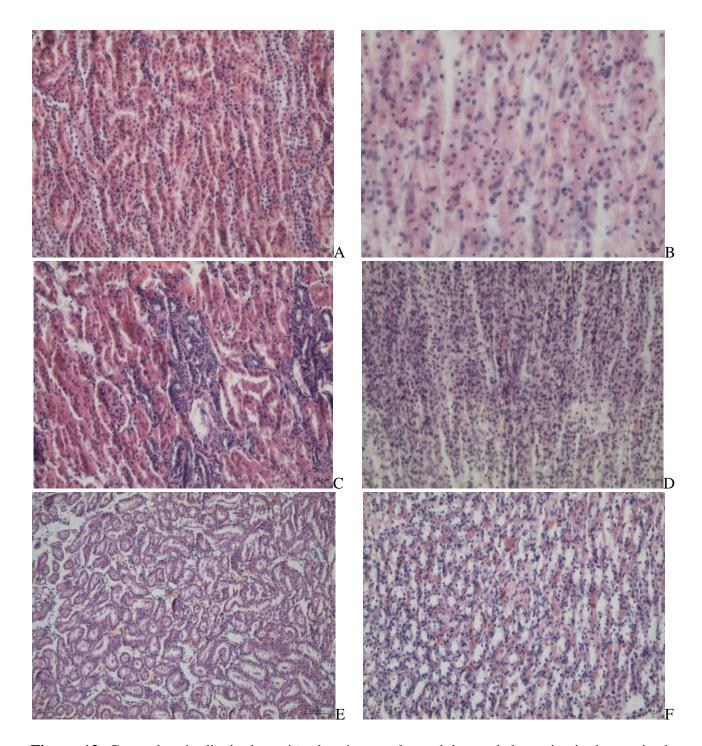


Figura 13. Cortes longitudinais da região do córtex e da medula renal dos animais do ensaio de toxicidade em dose repetida. A. túbulos contorcidos de animal do grupo controle (20X). B. Medula de animal do grupo controle (40X). C. Túbulos contorcidos de animal do EA 100 mg/kg evidenciando-se intensa proliferação celular (20X). D. Região medular de animal do grupo EA 100 mg/kg, evidenciando concentração anormal de núcleos. E. Túbulos contorcidos de animal do ELF 100 mg/kg evidenciando-se acúmulo de substâncias amorfas (20X). F. Região medular de animal do mesmo grupo evidenciando dilatação dos túbulos (20X).

4.4. Ensaio de atividade anti-inflamatória in vivo

4.4.1. Ensaio de edema de pata induzido por carragenina

A Tabela 5 e a Figura 14 ilustram os resultados obtidos no ensaio de edema de pata induzido pela carragenina. O controle positivo (indometacina 10 mg/kg) apresentou efeito anti-edematogênico significativo a partir da terceira hora (48, 24% de inibição).

Os animais dos grupos testados com o EA não apresentaram diferença estatística quando comparado ao grupo controle negativo nas doses testadas em nenhuma hora, embora seja evidente a diminuição do edema a partir da quinta hora nos grupos que receberam as doses de 100 e de 150 mg/kg. Todas as doses testadas do ELF produziram atividade antiedematogênica (54, 16% de inibição, 52,75% de inibição e 57, 77% de inibição em 6 h, para as doses de 50, 100 e 150 mg/kg, respectivamente), apresentando diferenças estatísticas do controle negativo já a partir da segunda hora, sendo estatisticamente iguais à indometacina em todos os momentos.

O EP produziu um efeito anti-edematogênico estaticamente significativo apenas a partir de 3 h apenas na dose de 150 mg/kg (44, 43% de inibição em 6 h).

Não foi possível observar um efeito claro de relação dose-resposta dos extratos analisados.

		Tempo (h)					
		1 2		3			
Tratamento	Doses (mg/kg)	Média±S.E.M.a	% Inibição ^b	Média±S.E.M.	% Inibição	Média±S.E.M	% Inibição
Controle Negativo	-	$0,28\pm0,11$	0,00	$0,58\pm0,19$	0,00	$0,85\pm0,21$	0,00
Indometacina	10	$0,29\pm0,14$	-0,59	$0,35\pm0,06$	39,37	$0,44\pm0,10^{c}$	48,24
EA	50	$0,27\pm0,11$	5,29	$0,64\pm0,12$	-10,34	$0,78\pm0,34^{d}$	8,63
EA	100	$0,26\pm0,12$	8,82	$0,53\pm0,14$	8,05	$0,95\pm0,18^{d}$	-11,76
EA	150	$0,36\pm0,07$	-25,29	$0,71\pm0,12$	-21,55	$1,02\pm0,06^{d}$	-20,00
EP	50	$0,35\pm0,09$	-21,76	$0,76\pm0,14$	-31,32	$0,91\pm0,17^{d}$	-7,25
EP	100	$0,27\pm0,07$	5,29	$0,60\pm0,13$	-3,16	$0,90\pm0,16^{d}$	-5,29
EP	150	$0,14\pm0,03$	50,00	$0,44\pm0,04$	24,14	$0,55\pm0,08^{c}$	35,88°
ELF	50	$0,20\pm0,09$	28,82	$0,25\pm0,10^{c}$	56,90	$0,43\pm0,12^{c}$	49,41
ELF	100	$0,11\pm0,08$	61,18	$0,19\pm0,06^{c}$	66,67	$0,30\pm0,11^{c}$	65,10
ELF	150	$0,22\pm0,06$	23,53	$0,20\pm0,07^{c}$	65,80	$0,31\pm0,15^{c}$	63,73

		Tempo (h)					
	_	4		5		6	
Tratamento	Doses (mg/kg)	Média±S.E.M.	% Inibição	Média±S.E.M.	% Inibição	Média±S.E.M.	% Inibição
Controle Negativo	-	0,99±0,14	0,00	1,08±0,20	0,00	1,06±0,21	0,00
Indometacina	10	$0,61\pm0,15^{c}$	38,93	$0,53\pm0,10^{c}$	50,70	$0,57\pm0,13^{c}$	46,00
EA	50	$1,09\pm0,15^{d}$	-9,56	$1,13\pm0,11^{d}$	-5,12	$1,08\pm0,14^{d}$	-1,73
EA	100	$1,02\pm0,22^{d}$	-2,68	$0,94\pm0,22^{d}$	12,25	$0,91\pm0,24^{d}$	14,76
EA	150	1,17±0,12	-17,79	$1,13\pm0,10$	-4,96	$1,03\pm0,10$	3,45
EP	50	$1,03\pm0,19^{d}$	-4,03	$1,03\pm0,19^{d}$	4,19	$1,04\pm0,16^{d}$	2,04
EP	100	$1,16\pm0,15^{d}$	-16,28	$1,07\pm0,21^{d}$	0,16	$1,01\pm0,26^{d}$	5,34
EP	150	$0,62\pm0,06^{c}$	37,25	$0,61\pm0,14^{c}$	43,41°	$0,59\pm0,11^{c}$	44,43
ELF	50	$0,51\pm0,12^{c}$	48,99	$0,57\pm0,19^{c}$	47,44	$0,49\pm0,15^{c}$	54,16
ELF	100	0.38 ± 0.18^{c}	62,25	$0,43\pm0,16^{c}$	60,31	$0,50\pm0,20^{c}$	52,75
ELF	150	0.46 ± 0.17^{c}	54,19	$0,54\pm0,23^{\circ}$	50,08	$0,45\pm0,27^{c}$	57,77

^a Cada valor representa a média \pm E.P.M. das diferenças (Δ) de espessura (mm) entre as patas esquerdas (com edema induzido) e patas direitas (sem indução de edema), n=6/grupo. ^b Porcentagem inibição do edema em relação ao controle negativo. ^c P < 0,05 em relação ao controle negativo e ^d P < 0,05 em relação à indometacina (controle positivo). Os dados foram analisados através da

ANOVA two-way, seguida do teste de Bonferroni.

____Resultados 43

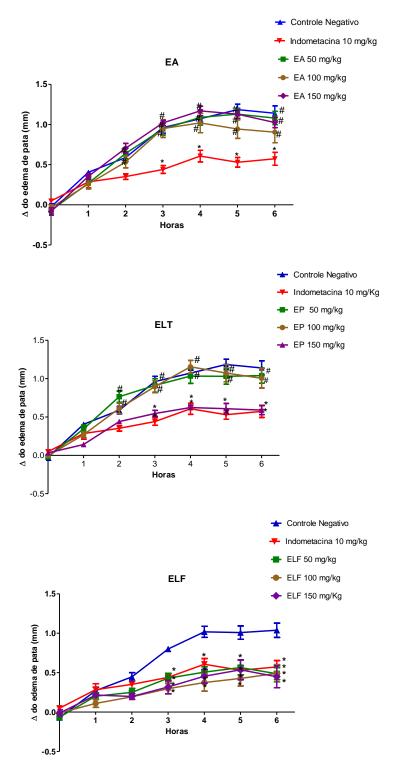


Figura 14. Efeito anti-edematogênico de diferentes concentrações dos extratos das folhas do yacón administrados por via oral em camundongos no ensaio de edema de pata induzido pela carragenina. Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M das diferenças (Δ) entre as patas esquerdas (injetadas) e patas direitas (não injetadas) de n=6/grupo. Os dados foram analisados através da ANOVA *two-way*, seguida do teste de Bonferroni. *P<0,05 em relação ao controle negativo e #P<0,05 em relação à indometacina 10 mg/kg.

Uma observação adicional e bastante interessante feita durante esse ensaio foi que a aplicação da carragenina na pata traseira dos camundongos Balb/C induziu a necrose da extremidade distal das caudas dos animais (Figura 15A). A necrose foi observada 24 h após a aplicação da carragenina e manteve-se até 72 h, sendo que os animais foram eutanasiados após esse período. A necrose foi observada nos animais dos grupos controle negativo e positivo, e nos grupos que receberam o EA e o EP. Contudo, não foi observada a necrose da cauda dos animais que receberam o ELF (Figura 15B).

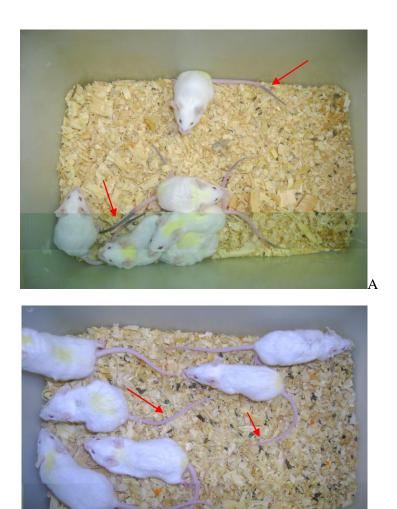


Figura 15. Efeito necrótico da cauda dos animais do ensaio de edema de pata induzido pela carragenina. A. Animais do grupo Controle Negativo, nos quais é possível observar a necrose da extremidade distal das caudas. B. Animais do grupo que recebeu o ELF na dose de 100 mg/kg (v.o.), nos quais não houve necrose nas caudas. Ambas as fotos foram obtidas 48 h após a indução do edema com carragenina nas patas posteriores dos animais.

4.4.2. Ensaio de edema de orelha induzido por óleo de cróton

O tratamento tópico dos animais com o EA resultou em uma redução dosedependente do edema de orelha, mas com efeito estatisticamente significativo (25% de inibição do edema) apenas na dose mais alta (0,5 mg/orelha) (Tabela 6). Esse efeito foi estatisticamente similar ao apresentado pela indometacina (28% de inibição do edema). A aplicação do EP resultou em efeito dose-dependente e estatisticamente significativo em todas as doses testadas (25,2, 30,1, e 42,7% de inibição do edema, respectivamente), com a inibição do edema a 0,25 e 0,5 mg/orelha maior do que a que a apresentada pela indometacina. O tratamento tópico com o ELF resultou em um efeito dose-dependente inverso, com efeito estatisticamente significativo na menor dose (0,125 mg/orelha, 41,1% de inibição do edema) e na dose intermediária (0,25 mg/orelha, 38,5% de inibição do edema), mas não na dose mais alta (0,5 mg/orelha, 18,9% de inibição do edema) (Tabela 6). Nas doses de 0,125 e 0,5 mg/orelha, o tratamento com ELF resultou em uma redução do edema mais expressiva do que a apresentada pela indometacina.

A redução da atividade da MPO esteve estatisticamente diminuída em relação aos grupos controle em todas as doses testadas de todos os extratos e indometacina (Tabela 6). Todos os extratos resultaram em efeitos mais pronunciados sobre a atividade da MPO do que a indometacina (0,5 mg/orelha, 8,02 x 10⁵ neutrófilos/orelha), sendo que o EP (0,5 mg/orelha, 1,45 x 10⁵ neutrófilos/orelha) e o ELF (0,5 mg/ear, 0,91 x 10⁵ neutrófilos/orelha) mostraram um efeito mais pronunciado sobre a MPO do que o EA (0,5 mg/orelha, 2,75 x 10⁵ neutrófilos/orelha).

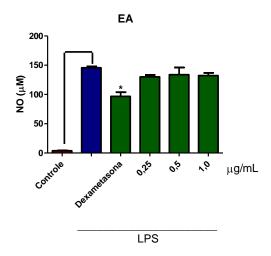
Os tratamentos com a indometacina, EA e EP não resultaram em efeitos estatisticamente significativos sobre a concetração da IL-10 nas orelhas dos animais quando comparados ao grupo controle (Tabela 6). Contudo, a concentração da IL-10 estava estatisticamente aumentada nas orelhas dos animais tratados com o ELF em todas as concentrações testadas (Tabela 6).

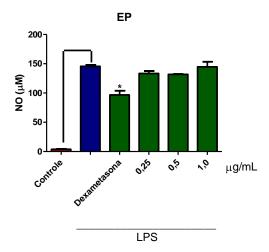
Tabela 6. Resultados obtidos no ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton

Tuotomonto	Dose Peso do edema		% de inibição	Atividade da MPO	IL-10	
Tratamento	(mg/orelha)	(mg)	do edema	$(N^{\circ} neutrófilos 10^5/orelha)$	(10^5 pg/mL)	
Controle	-	14,30 ± 1,19	0,0	13,95 ± 2,11	$3,16 \pm 0,30$	
Indometacina	0,5	$10,30 \pm 0,88*$	28,0	$8,02 \pm 1,05*$	$2,67 \pm 0,25$	
EA	0,125	$12,60 \pm 0,70$	11,9	$1,53 \pm 0,18*$	$3,36 \pm 0,78$	
	0,25	$11,80 \pm 1,22$	17,5	$1,61 \pm 0,16*$	$3,23 \pm 0,35$	
	0,5	$10,60 \pm 0,68*$	25,9	$2,75 \pm 0,45*$	$3,35 \pm 0,29$	
EP	0,125	$10,70 \pm 2,41*$	25,2	$2,22 \pm 0,76*$	$4,24 \pm 0,85$	
	0,25	$8,20 \pm 3,19*$	42,7	$1,51 \pm 0,77*$	$4,08 \pm 0,25$	
	0,5	$10,00 \pm 2,58*$	30,1	$1,45 \pm 0,35*$	$3,59 \pm 0,39$	
ELF	0,125	$8,80 \pm 0,99*$	38,5	$1,22 \pm 0,56*$	$4,81 \pm 0,08*$	
	0,25	$8,00 \pm 0,94*$	44,1	$1,19 \pm 0,27*$	$5,21 \pm 0,15*$	
	0,5	$11,60 \pm 0,84*$	18,9	$0.91 \pm 0.24*$	$5,02 \pm 0,62*$	

4.5. Atividade anti-inflamatória in vitro

A partir dos sobrenadantes obtidos na cultura de células RAW 264.7 induzidas com LPS foram realizados as quantificações do óxido nítrico (NO) através da reação de Griess (Figura 16) e quantificação do fator de necrose de tumor TNF-α (Figura 17) e da prostaglandina PGE₂ (Figura 18). O EA e o ELF não foram capazes de inibir a produção do NO induzida pelo LPS nas células, contudo o tratamento das células com o ELF resultou em uma marcante inibição do NO de maneira dose-dependente. Todos os extratos foram capazes de inibir moderadamente a produção do TNF-α, sendo que o ELF mostrou uma tendência à apresentar uma curva dose-dependente, enquanto o EA e o EP resultaram em efeitos estatisticamente iguais em todas as doses testadas. De maneira similar, todos os extratos foram capazes de inibir a PGE₂ em cultura, sendo os efeitos do ELF e do EA mais pronunciado em relação ao EP. O ELF foi o único extrato com efeito dose-depndente sobre a PGE₂.





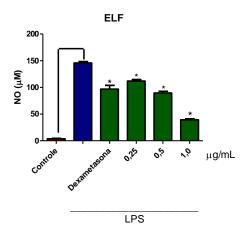
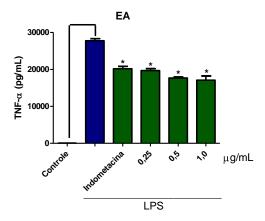
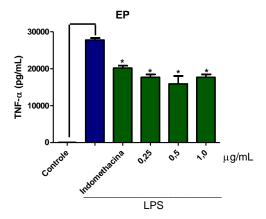


Figura 16. Dosagem do óxido nítrico (NO) em culturas de células RAW 264.7 estimuladas com LPS após o tratamento com os diferentes extratos. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. ANOVA, seguinda pelo teste de Dunnet, * P≤ 0,05 em relação ao controle não estimulado com LPS.





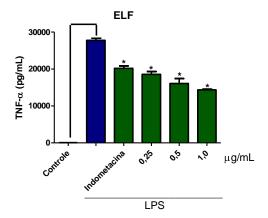
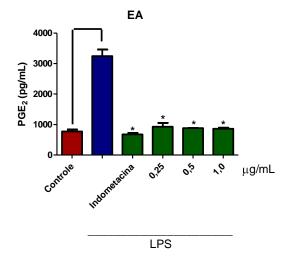
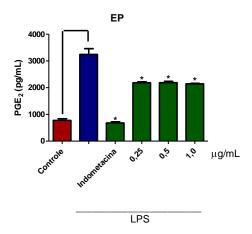


Figura 17. Dosagem do fator de necrose de tumor TNF-α em culturas de células RAW 264.7 induzidas com LPS após o tratamento com os diferentes extratos. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. * P≤ 0,05 em relação ao controle não estimulado com LPS.





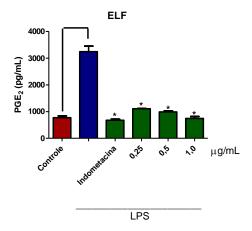


Figura 18. Dosagem da PGE2 em culturas de células RAW 264.7 induzidas com LPS após o tratamento com os diferentes extratos. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. * P≤ 0,05 em relação ao controle não estimulado com LPS.

4.6. Atividade anti-diabética

Para verificar o potencial anti-diabético dos extratos foram realizados um experimento *in vitro* e um experimento *in vivo* de ação hipoglicemiante. O ensaio *in vitro* realizado foi o de inibição da α-amilase, o qual é bastante utilizado para avaliar substâncias com uso potencial como hipoglicemiantes orais. No ensaio *in vivo* os extratos foram administrados a camundongos no chamado "teste de intolerância oral à glicose", com o objetivo de verificar se os extratos são capazes de interferir na resposta aguda da insulina induzida pela glicose.

4.6.1. Ensaio de inibição da α-amilase in vitro

A dose (1 μg/mL) escolhida para ser utilizada nesse ensaio representa a maior dose dos extratos que não causou citoxicidade aos macrófagos em cultura no ensaio de viabilidade celular descrito no item 3.7.2. A atividade máxima da enzima foi obtida incubando-se a enzima com o substrato (amido), seguido pela adição do reagente de cor. A atividade dos extratos e do controle positivo (acarbose) foi calculada em porcentagem de inibição da enzima, utilizando o controle de atividade máxima da enzima como referência. Os resultados estão ilustrados na Figura 19. Todos os extratos foram capazes de inibir a atividade máxima da enzima, sendo o ELF o mais eficiente (61,98% de inibição), seguido pelo EP (55,42% de inibição) e pelo EA (52,47% de inibição). Contudo, nenhum dos extratos foi mais eficiente do que acarbose, utilizada na mesma dose (70,79% de inibição).

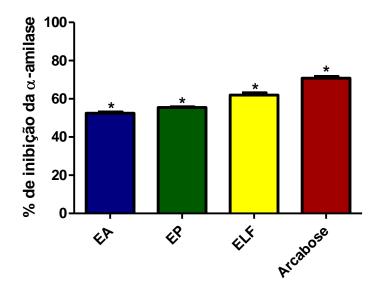


Figura 19. Porcentagem de inibição da α-amilase em relação ao controle de máxima atividade da enzima. Os dados estão expressos em média \pm E.P.M. de experimentos em triplicata realizados em dois experimentos independentes. * $P \le 0.05$ em relação ao controle de atividade máxima da enzima, obtido por ANOVA *one-way*, seguido pelo teste de Dunnett.

4.6.2. Teste de intolerância oral à glicose

A dose utilizada nesse ensaio (10 mg/kg) correspondeu à menor dose utilizada no ensaio de toxicidade em dose repetida. O teste de intolerância à glicose foi realizado com os animais em jejum. A glicemia foi medida em todos os animais no tempo zero (antes da administração dos extratos, veículo e droga de referência). Os extratos, veículo e droga de referência foram administrados via oral aos camundongos e a glicemia foi medida após 30 min. Após essa medida, os animais receberam glicose via oral (1 g/kg), sendo realizadas três medidas subsequentes da glicemia a cada 30 min. Os resultados estão ilustrados na Tabela 7.

O EA foi o mais efetivo em diminuir os níveis glicêmicos após a administração oral de glicose. Os níveis glicêmicos dos animais tratados com o EA se normalizaram a partir dos 90 min (197,5 \pm 8,9), ficando estatisticamente similar ao do grupo controle que não recebeu a glicose (165,9 \pm 5,5). Esse resultado foi semelhante ao da metformina, a qual foi estatisticamente similar ao Controle jejum a partir de 90 min (Controle jejum 165,9 \pm 5,5, metformina 193,7 \pm 9,8). Os animais que receberam o EP ficaram com níveis de glicose estatisticamente similar ao controle apenas nos 120 min (Controle jejum 148,5 \pm 7,8, EP 176,5 \pm 7,3). No entanto, os animais que receberam o ELF não tiveram seus níveis de glicemia normalizados em nenhum dos tempos avaliados.

Tabela 7. Efeito dos diferentes extratos das folhas do yacón sobre os níveis de glicose (mg/dL) em jejum em camundongos normais

	0	30 min	60 min	90 min	120 min
^a Controle jejum	$184,5 \pm 9,3$	$183,5 \pm 6,2$	$177,5 \pm 8,3$	$165,9 \pm 5,5$	$148,5 \pm 7,8$
^b Controle glicêmico	$211,0\pm 9,5$	$158,5 \pm 7,8$	$322,0 \pm 5,9*$	$265, 4 \pm 7,4*$	$201.8 \pm 5.2*$
EA	$224,5 \pm 8,3$	$174,0 \pm 8,0$	$403,0 \pm 9,1*$	$197,5 \pm 8,9$	$169,0 \pm 4,9$
EP	$206,1\pm7,3$	$185,5 \pm 9,1$	$396,5 \pm 6,3*$	$233, 3 \pm 9,2*$	$176,5 \pm 7,3$
ELF	$217,5 \pm 8,8$	$188,5 \pm 8,7$	$382,4 \pm 5,8*$	$264.9 \pm 9.6*$	$219,1 \pm 7,6*$
Metformina	$178,1\pm9,1$	$170,5\pm7,4$	$281,2 \pm 7,1*$	$193,7\pm9,8$	$170,2\pm5,7$

^a Controle jejum recebeu apenas o veículo e não recebeu glicose.

^b Controle glicêmico recebeu o veículo e a glicose.

Os demais grupos receberam os extratos ou droga de referência e a glicose.

Os resultados estão expressos como média \pm E.P.M, n=6 animais por grupo. * $P \le 0.05$ em relação ao Controle jejum (ANOVA two-way, seguida pelo teste de Bonferroni).

5. Discussão

No presente estudo, análises fitoquímicas foram realizadas para confirmar as principais classes químicas dos metabólitos secundários em cada um dos três extratos das folhas do yacón. As análises de espectroscopia no IV combinadas com os perfis cromatográficos por CLEA-UV-DAD demonstraram que o ELF é rico em LST, enquanto o EP é rico em ACG. No EA foram encontrados tanto ACG quanto LST, o que nos leva a acreditar que ambas as classes químicas estão presentes nos infusos preparados e consumidos na forma de chá na medicina popular.

Os resultados obtidos no ensaio de toxicidade em dose repetida aqui apresentados e discutidos foram publicados no periódico *Journal of Ethonopharmacology* (Oliveira *et al.*, 2011, ANEXO I). Nesse ensaio, os ratos foram tratados com os extratos (10, 50, 100 ou 1.000 mg/kg) por um período de 90 dias. Apesar dos níveis de triacilglicerideos, albumina e proteínas totais estarem aumentados em ratos tratados com o EP (1.000 mg/kg), esses animais não apresentaram sinais comportamentais de toxicidade. A análise histológica dos órgãos de animais tratados com esse extrato não apresentou anomalias graves. Isso sugere que a administração oral repetida da folha de extrato de yacón sem LST (EP) foi segura.

Os animais tratados com EA mostraram sinais de toxicidade como hipoatividade e astenia quando comparados aos ratos controle. As análises bioquímicas demonstraram níveis aumentados da AST, triacilglicerideos, albumina, proteínas totais, creatinina e glicose.

Os níveis de albumina e proteínas totais estão relacionados, pois a albumina corresponde a 50% da proteína total no soro (Doweiko & Nompleggi, 1991). Assim, os altos níveis de proteínas totais observados pode ser simplesmente um reflexo dos altos níveis de albumina. A função mais importante da albumina é o seu papel na manutenção do volume plasmático, sendo responsável por 80% da pressão coloidosmótica. A albumina também é crítica para o transporte de várias substâncias no sangue. No entanto, as causas do aumento dos níveis de albumina são mal compreendidas. Um estudo relatou uma relação entre níveis elevados de albumina e desidratação, que podem estar relacionadas à função renal (Willard *et al.*, 1994).

Neste estudo o aumento do nível de creatinina após a administração do EA a 100 mg/kg sugeriu dano renal, visto que a alteração nos níveis de creatinina sérica é um indicador de tal dano (Bishop *et al.*, 2000; Muntner *et al.*, 2000). Além disso, alterações no

metabolismo dos ácidos graxos têm sido relatados em pacientes com doença renal crônica (Muntner *et al.*, 2000). Essas alterações no metabolismo dos ácidos graxos são caracterizadas por níveis aumentados de colesterol total e triacilglicerideos (Muntner *et al.*, 2000). Aumento dos níveis de triacilglicerideos e de um elevado nível de creatinina foi detectado no grupo que foi observado por 14 dias após o tratamento com o EA 100 mg/kg. Muntner *et al.* (2000) também relataram que os níveis séricos de glicose estão aumentados em casos de doença renal crônica. No presente estudo, os níveis de glicose estavam aumentados em todos os ratos que foram tratados com EA independentemente da dose. Curiosamente, a doença renal crônica resulta em um bloqueio da degradação da insulina (Chen *et al.*, 2003). Na fase inicial da doença, uma redução dos níveis de glicose ocorre devido ao aumento dos níveis de insulina no sangue. Mais tarde, os níveis de insulina permanecem elevados, mas se desenvolve um quadro de resistência à insulina. Assim, a glicose não é transportada para as células mais internas, o que resulta no aumento dos níveis de glicose no sangue (Chen *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado por Aybar *et al.* (2001), a administração oral do extrato aquoso de yacón durante 30 dias resultou em diminuição dos níveis sanguíneos de glicose em ratos diabéticos. O extrato aquoso utilizado em nosso estudo foi preparado da mesma forma como em Aybar *et al.* (2001), porém o extrato foi administrado por 90 dias ao invés de 30, tempo suficiente para a progressão da doença renal crônica e conseqüente aumento dos níveis de glicose plasmática. Assim, as análises bioquímicas do presente estudo sugerem que a administração oral prolongada do infuso do yacón pode reverter o efeito hipoglicemiante, aumentando os níveis de glicose no plasma, o que não foi observado quando o extrato foi administrado durante um período curto de tempo. Essa reversão foi provavelmente devido à lesão renal. De fato, uma leitura atenta dos dados da Aybar *et al.* (2001) sugeriu que os níveis de glicose foram diminuídos até o quarto dia e então começaram a aumentar até o trigésimo dia, mesmo com aumento dos níveis de insulina. Essa observação corrobora a hipótese de que o efeito hipoglicemiante é reversível após vários dias de tratamento com a infusão na forma de chá.

O ELF foi altamente tóxico na dose de 1.000 mg/kg e causou a morte de todos os ratos após apenas alguns dias de tratamento. Com uma dose de 100 mg/kg, o ELF causou sérios sinais de toxicidade, incluindo anorexia e dificuldade respiratória. As análises bioquímicas do sangue desses ratos indicaram um aumento dos níveis das proteínas totais, albumina, creatinina, que também apontaram para o dano renal.

Para comprovar o dano renal apontado pelos testes bioquímicos, foi realizada a análise histológica dos rins. Os ratos que foram tratados com o ELF 100 mg/kg apresentaram

dano renal grave caracterizado pela degeneração dos glomérulos, e material amorfo depositado na parte interna dos túbulos renais. A presença desse material amorfo foi relatada na literatura como um depósito de proteínas imunológicas globulares de cadeias leves κ ου λ (Lin *et al.*, 2001). Os ratos que foram tratados com o ELF 10 mg/kg mostraram alterações morfológicas menos intensas. Dano renal semelhante foi relatado em um estudo que descreve a toxicologia do extrato etanólico de *Tithonia diversifolia* (Elufioye *et al.*, 2009). De forma semelhante ao yacón, a espécie *T. diversifolia* possui tricomas secretores sobre a superfície foliar, e os principais compostos nesses tricomas são LST (Ambrósio *et al.*, 2008). Este fato sugere que LST podem desempenhar um papel importante na toxicidade dessas espécies.

As alterações histológicas observadas neste estudo corroboram as alterações bioquímicas encontradas no sangue. Em conjunto, os resultados confirmam que a administração de doses repetidas de um extrato aquoso na forma de infuso das folhas de yacón, tal como é utilizado na medicina popular, pode levar ao desenvolvimento de dano renal. Além disso, os resultados confirmam o elevado nível de toxicidade induzida pelo tratamento com ELF, que é rico em LST. Assim, devido ao fato de que os dois extratos que causaram toxicidade (EA e ELF) apresentarem LST em sua constituição, e pelo fato dessas substâncias serem repetidamente apontadas como tóxicas na literatura (Schmidt, 1999), podese concluir que as LST são as responsáveis pela toxicidade observada.

Para saber se a dose administrada aos ratos nesse estudo corresponde a uma dose em uma situação real em humanos, foram utilizados cálculos alométricos na extrapolação das doses administradas aos animais para os humanos. A extrapolação direta da dose administrada aos animais para humanos usando uma conversão simples do peso corporal não é recomendada. Isso porque a taxa de absorção das drogas diminui com o aumento da superfície corporal, mas a relação entre a superfície corporal e o peso não é linear. Assim, a literatura recomenda que a conversão seja feita utilizando cálculos alométricos (Travis & White, 1998; Reigner & Blesch, 2002). Nesse tipo de conversão, o primeiro passo é o cálculo da área da superfície corporal (*Body Surface Area*, BSA) dada em m² para ambas as espécies (humano e rato, ou humano e camundongo etc.). Para ratos, por exemplo, a BSA pode ser calculada usando a seguinte fórmula matemática:

$$BSA = 1.85 \times (W/70)^{0.67}$$

Na qual W representa o peso corporal do rato. Para humanos, a BSA é dada na literatura como 1,8 m². Subseqüentemente é necessário fazer a transformação da dose em

mg/kg para mg/m². A agência norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*) também recomenda que a extrapolação da dose utilizada em humanos para a dose aplicada nos animais seja calculada utilizando a BSA. Para isso, a FDA criou uma tabela de fatores BSA baseados na fórmula descrita acima, com o objetivo de facilitar os cálculos (FDA, 2005). Para ratos, o fator BSA é 6,2. Para encontrar o valor equivalente da dose administrada em humanos, basta dividir a dose administrada aos ratos (em mg/kg) por 6,2.

Neste estudo, a dose de 50 mg/kg do EA liofilizado (menor dose que causou toxicidade) corresponde a 555 mg/kg das folhas secas/kg de peso corporal. Assim, utilizando o fator BSA da FDA (2005), 555 mg/kg ÷ 6.2 = 89,5 mg/kg x 70 kg = aproximadamente 6 g como equivalente em humanos. Como cada saquinho de chá de yacón comercializado possui cerca de 2 g de folha seca, isso significa que 50 mg/kg do extrato administrado para o rato em um dia corresponde a três xícaras de chá em um dia para um humano com 70 kg de peso corporal. Essa quantidade de chá é real em uma situação cotidiana. Apenas a menor dose administrada do EA (10 mg/kg) não mostrou toxicidade, mas essa dose corresponde a menos que um saquinho de chá por dia (0,6 g), o que não é usual em uma situação cotidiana. Assim, não deve ser recomendado o consumo humano do chá das folhas do yacón, visto que a dose equivalente em humanos de 6 g da droga consumida por longos períodos de tempo pode ser tóxica.

Na tentativa de atender ao objetivo deste trabalho, que foi verificar quais as possíveis classes de substâncias (LST ou ACG) contribuem para a atividade anti-inflamatória do yacón, e levando em consideração a atividade tóxica oral descrita para a espécie, foram utilizados dois modelos de ensaios biológicos *in vivo* de inflamação aguda. O primeiro foi o ensaio de edema de pata induzido pela carragenina e o segundo foi o ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Os dois modelos desencadeiam respostas inflamatórias distintas, com predominância de diferentes mediadores inflamatórios em cada um deles.

A carragenina é um polissacarídeo obtido de algas marinhas que vem sendo utilizado em estudos anti-inflamatórios há muitos anos. No modelo de edema de pata induzido pela carragenina, vários mediadores da inflamação operam em seqüência, em tempos já bem definidos na literatura, para produzir a inflamação. Na primeira fase de desenvolvimento do edema (0 – 1 h) ocorre a liberação da histamina, da 5-hidroxitriptamina e da bradicinina (Di Rosa *et al.*, 1971). A segunda fase (1 - 6 h) está relacionada à produção elevada de prostaglandinas (PGs) liberadas pela ação conjunta da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) e do NO (Di Rosa *et al.*, 1971; Siebert *et al.*, 1994; Salvemini *et al.*, 1996). A COX-2 pode ser induzida pela atividade da IL-1 e do TNF-α, os quais são transcritos através da ação do NF-

В

κB (Salvemini et al., 1996). A infiltração local de neutrófilos e ação do NO também contribuem para a resposta inflamatória nesse modelo por produzir, entre outros mediadores, radicais livres derivados do oxigênio (O_2) e radicais hidroxila (Salvemini et al., 1996).

O óleo de cróton é extraído de *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), sendo composto de ésteres de forbol, em especial o 13-acetato de tetradecanoilforbol, mais conhecido como TPA, e para o qual tem sido atribuída a atividade promotora de inflamação do óleo de cróton (Hecker *et al.*, 1968; Sorg *et al.*, 1982; Rao *et al.*, 1993). Ao ser aplicado topicamente, o TPA mobiliza fosfolipídios da membrana plasmática das células epiteliais, resultando na formação do ácido araquidônico (AA) (Evans & Edwards, 1987; Mujumdar & Misar, 2004). O AA pode sofrer oxidação pelas enzimas COXs ou por uma lipooxigenase, resultando na produção de eicosanóides (PGs, prostaciclinas e tromboxanos) na via ciclooxigenase-dependente, ou leucotrienos na via lipooxigenase-dependente (Alberts *et al.*, 1997). Assim, ao contrário do que ocorre no edema de pata induzido pela carragenina, no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton não há a liberação de histamina, sendo as prostaglandinas e leucotrienos os mediadores da inflamação predominantes em um período de 6 h após a indução do edema. A Figura 10 resume a resposta inflamatória desencadeada em ambos os modelos.

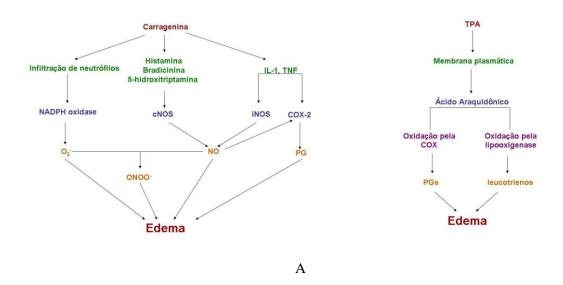


Figura 20. Modelos de inflamação. A. Mediadores envolvidos na inflamação no ensaio de edema de pata induzido pela carragenina (modificado de Salvemini *et al.*, 1996). B. Modelo de atuação dos mediadores da inflamação no ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (modificado de Alberts *et al.*, 1997).

Nos resultados obtidos no ensaio de pata induzido pela carragenina, o EA não apresentou atividade anti-inflamatória em nenhuma das doses testadas, enquanto o EP (dose de 150 mg/kg) e ELF (todas as doses testadas) apresentaram atividade anti-dematogênica a partir da terceira hora, indicando que nenhum dos extratos foi capaz de inibir a liberação da histamina. A inibição do edema pelo EP e ELF nas horas subsequentes indica que ambos os extratos podem agir inibindo a liberação de PGs. Essa hipótese foi confirmada nos ensaios in vitro, visto que ambos os extratos foram capazes de inibir a liberação da PGE₂ induzida pelo LPS nas células RAW 264.7. Contudo, a ação do ELF sobre a PGE₂ foi mais potente comparado ao EP, o que pode explicar, em parte, o fato de todas as doses do ELF terem sido anti-edematogências, enquanto apenas a maior dose do EP teve efeito. No modelo de inflamação induzida pela carragenina, as PGs podem ser liberadas por ação da enzima COX-2, cuja atividade pode ser aumentada por ação do NO (Salvemini et al., 1996). O ELF foi capaz de inibir a liberação do NO in vitro em doses muito baixas, enquanto o EP teve pouca atividade na inibição do NO, sendo capaz de alguma inibição apenas em doses elevadas. Os resultados obtidos no ensaio de inibição do NO in vitro e o resultado obtido no ensaio de edema de pata e nos demais ensaios in vitro sugerem, portanto, que o ELF pode exercer uma inibição na liberação das PGs por meio da inibição da atividade da enzima COX-2 e pela inibição da liberação do NO, o qual potencializa a atividade das mesmas. Como o ELF é rico em LST e estas são capazes de inibir a ativação do fator de transcrição NF-κB (Schorr et al., 2007), esse extrato pode realmente atuar na inibição da liberação de PGs. Essa dupla atuação (inibição de PG e NO) poderia explicar o fato da atividade anti-edematogênica do ELF ser mais potente do que a do EP no ensaio de edema de pata induzido pela carragenina, pois o EP não se mostrou um inibidor potente de NO in vitro. Os resultados obtidos nesse ensaio sugerem, portanto, que ambos os extratos possuem atividade anti-inflamatória, porém com mecanismos de ação distintos.

Todos os extratos demonstraram possuir atividade anti-edematogêniuca no ensaio de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Essa atividade anti-edematogênica pode estar relacionada a uma atividade anti-infalamatória mais complexa, visto que todos os extratos foram capazes de diminuir a migração dos neutrófilos para o local da inflamação, conforme demosntrado na dosagem da MPO nas orelhas dos camundongos. O EA foi o extrato menos efetivo, diminuindo o edema apenas na dose mais alta, porém, diminuindo a migração dos nuetrófilos em todas as doses testadas. Adicionalmente, os tratamentos com o EA não resultaram em efeitos sobre a concentração da IL-10 nas orelhas dos animais. Os tratamentos com o EP resultaram em efeitos anti-edematogênicos e diminuição da migração de neutrófilos

em todas as doses testadas, mas não tiveram efeitos sobre a concentração da IL-10. O ELF, por sua vez, mostrou efeito anti-edematogênico em duas doses e diminuição da migração de neutrófilos e aumento da concentração da IL-10 em todas as doses testadas, indicando que o ELF deve conter as substâncias mais ativas nesse modelo de inflamação. Foi demonstrado que a IL-10 é um inibidor natural da inflamação cutânea induzida pelo óleo de cróton (Berg *et al.*, 1985). Assim, substâncias capazes de induzir a liberação da IL-10 no tecido inflamado tem uso potencial como anti-inflamatório tópico. Contudo, o efeito dose-dependente inverso observado para o ELF sobre o edema pode ser devido à toxicidade do extrato em altas doses no tecido da orelha, indicando que o extrato e seus compostos devem ser utilizados em doses baixas.

Os ensaios *in vitro* forneceram alguns indícios dos mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória dos três extratos. O EA e EP não foram capazes de inibir a liberação do NO induzido por LPS em macrófagos, enquanto o ELF se mostrou um potente inibidor. Os três extratos tiveram uma atividade baixa sobre a liberação do TNF-α, indicando que nem as LST e nem os ACG possuem atividade significativa sobre esse mediador da inflamação. Contudo, todos os extratos foram capazes de inibir a produção da PG₂ induzida pelo LPS, sendo que o EA e o ELF resultaram em uma diminuição mais potente da produção dessa prostaglandina, sugerindo que as LST possuem papel fundamental nessa atividade apresentada pelos extratos.

Para a inferência da atividade anti-diabética foram realizados experimentos com o objetivo de verificar a capacidade hipoglicemiante dos extratos, sendo um experimento in vitro de inibição da enzima α-amilase e um in vivo de tolerância oral à glicose. As α-amilases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de polissacarídeos, como o amido ou glicogênio, formando unidades menores de carboidratos (maltose e oligossacarídeos) que podem ser completamente digeridas pelo organismo (MacGregor et al., 2001; Yoon & Robyt, 2003). Inibidores dessa enzima podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento do diabetes tipo II, pois reduzem os níveis de glicemia pós-prandial e melhoraram a resposta aguda da insulina induzida pela glicose (Kandra et al., 2005; MacGregor et al., 2001; Yoon & Robyt, 2003). Os três extratos investigados no presente estudo foram capazes de inibir a α-amilase salivar humana, contudo de maneira menos eficiente do que a droga de referência utilizada como controle (acarbose). O ELF foi o mais potente nessa atividade, contudo seu uso não é recomendado devido à grande concentração de LST. Os ACG isolados a partir das folhas dos yacón, em especial os ácidos altráricos, mostraram-se potentes inibidores da α-glucosidase (Terada et al., 2009), indicando que essas substâncias presentes no yacón são boas candidatas para o uso como hipoglicemiantes orais no tratamento do diabetes tipo II, visto que não parecem apresentar toxicidade. O EP e o EA, extratos que contêm essas substâncias no nosso estudo, inibiram de forma moderada a α-amilase salivar humana, podendo essa ação se somar à inibição da α-glucosidase no controle da glicemia. Contudo, acreditamos que essas substâncias devam ser testadas para o uso em sua forma pura, ou em extratos padronizados sem as LST, e não na forma de preparados populares devido à toxicidade apresentada pelas LST.

No ensaio *in vivo* de intolerância oral à glicose, o EA e o EP mostraram-se mais eficientes na normalização dos níveis glicêmicos após a administração oral da glicose do que o ELF. Os dados deste trabalho indicam que as substâncias responsáveis pelos efeitos hipoglicemiantes verificados no uso popular das folhas yacón são os ACG e não as LST. Esses resultados estão de acordo com os de Genta *et al.* (2010), que demonstraram que a fração butanólica rica em ACG oriunda de um extrato metanólico preparado a partir da folhas do yacón foi mais eficiente no efeito hipoglicemiante em ratos normais e com diabetes induzida do que a fração AcOEt, rica em LST. Contudo, esses autores testaram o efeito da LST enidrina isolada das folhas do yacón nos modelos *in vivo* com ratos normoglicêmicos e com ratos com diabetes induzida. Os resultados demonstraram que essa LST isolada é capaz de normalizar os níveis glicêmicos dos animais quando administrada por um período de tempo de oito semanas. Assim, é provável que as LST também participem do efeito antidiabético observado no uso popular da espécie, porém os dados precisam ser melhor investigados.

Esses resultados são coerentes, visto que ação anti-inflamatória e a anti-diabética estão relacionadas e as LST mostraram-se potentes anti-inflamatórias. O diabetes é uma síndrome metabólica causada principalmente por um processo inflamatório que causa uma lesão nas células β do pâncreas, bem como nas ilhotas de Langerhans, tendo sido demonstrado que mediadores da inflamação, tais como as prostaglandinas, algumas citocinas e TNF-α possuem papel determinante no desenvolvimento do quadro diabético (Robertson, 1983; Tran *et al.*, 1999). O efeito das prostaglandinas parecem ser os mais determinantes. Foi demonstrado que as prostaglandinas são capazes de aumentar a produção hepática da glicose e de inibir a resposta aguda da insulina induzida pela glicose (Robertson, 1983; Tran *et al.*, 1999). Dessa forma, as prostaglandinas são responsáveis pela manutenção de altos níveis da glicose sanguínea. Adicionalmente, ficou demonstrado que drogas capazes de inibir a liberação das prostaglandinas, em especial a PGE₂, tal como a aspirina e o ibuprofeno, são capazes de aumentar a resposta da insulina induzida pela glicose em humanos e ratos normais e diabéticos, bem como restaurar parcialmente a resposta à insulina e melhorar o quadro de

intolerância intravenosa à glicose em humanos e ratos diabéticos (Robertson, 1983; Tran *et al.*,1999). Assim, a ação das LST sobre as prostaglandinas pode estar relacionada aos efeitos hipoglicemiantes e tóxicos observado para o EA e para o ELF, bem como para enidrina no estudo de Genta *et al.* (2010).

As prostaglandinas possuem também importante função na regulação da função renal. A PGE₂ produzida nas células dos rins mantém o fluxo renal e as taxas de filtração glomerular através da regulação da vasoconstrição e aumento das concentrações plasmáticas de catecolaminas, angiotensina e vasopressina (Dun, 1984). A inibição da ciclooxigenase, e consequente inibição da mobilização do ácido araquidônico por drogas anti-inflamatórias não esteroidais, reduz a produção da PGE₂ renal, exagerando a vasoconstrição renal e, portanto, diminuindo o fluxo sanguíneo renal e as taxas de filtração glomerular, podendo causar uma doença renal crônica ou reversível (Dun, 1984). Os danos renais observados nos animais tratados com o EA e com o ELF pode ter sido uma consequência da supressão da PGE₂ nos rins dos animais. Essa hipótese é corroborada pela observação do influxo de macrófagos observado nos rins dos animais tratados com EA, visto que foi demonstrado que as prostaglandinas suprimem a infiltração de macrófagos nos rins, sendo que a inibição das prostaglandinas nesse órgão levou a um quadro de glomerulite inflamatória desencadeada pelos macrófagos (Catell *et al.*,1990).

Assim, é bastante provável que as atividades anti-diabética, anti-inflamatória e tóxica desencadeadas pelos extratos obtidos a partir das folhas do yacón estejam todas interrelacionadas. Da mesma forma, é provável que tanto as LST quanto os ACG desempenhem papéis importantes para que essas atividades ocorram, sendo as LST as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos e anti-inflamatórios observados, mas também com contribuições significativas no efeito anti-diabético, enquanto os ACG parecem não contribuir para a toxicidade, mas exercem papel nos efeitos anti-inflamatórios e principalmente no efeito anti-diabético.

6. Conclusão

- Os estudos fitoquímicos demonstraram que o EFL é rico em LST, o EP é rico em ACG, enquanto o EA apresentou ambas as classes químicas, demonstrando dessa forma que tanto os ACG, quanto as LST estão presentes em preparados populares com as folhas do yacón;
- A administração oral do EA e do EFL em regime de dose repetida em ratos causou toxicidade caracterizada por dano renal, enquanto a administração do EP não resultou em efeitos tóxicos significativos;
- O fato de as LST estarem presentes no EA e no EFL, mas ausentes no EP sugerem que as LST são os compostos responsáveis pela toxicidade dos extratos, e que os ACG parecem não causar toxicidade;
- Os três extratos (EA, EFL e EP) demonstraram atividade anti-edematogênica *in vivo*. Essa atividade pode ser conseqüência de uma atividade anti-inflamatória, visto que todos os extratos demonstraram possuir algum efeito sobre marcadores ou mediadores da inflamação, sugerindo que tanto as LST, quanto os ACG contribuem para os efeitos observados;
- A atividade anti-diabética descrita para as folhas do yacón pode estar relacionada à inibição de enzimas catalisadoras da hidrólise de carboidratos, visto que os três extratos testados nesse trabalho demonstraram inibir, embora de forma moderada, a atividade da α-amilase. Essa atividade parece ter maior influência dos ACG do que das LST:
- A atividade anti-diabética pode estar relacionada, ainda, a uma melhora na resposta aguda à insulina, conforme observado no teste de intolerância oral à glicose. Esse experimento também revelou que os ACG parecem ter maior efeito sobre a atividade hipoglicemiante do que as LST. Essa observação está de acordo com outros estudos sobre a atividade anti-diabética do yacón encontrados na literatura;
- As atividades anti-diabética, anti-inflamatória e tóxica demonstradas para o yacón parecem estar relacionadas, Os ACG são responsáveis pelos efeitos hipoglicemiantes observados, enquanto as LST podem contribuir com a atividade anti-

diabética devido à supressão de mediadores inflamatórios que atuam no desenvolvimento do diabetes. Contudo, a administração prolongada de extratos com LST causa toxicidade que resulta em uma reversão da atividade anti-diabética observada, principalmente devido ao dano renal;

• Dessa forma, com base nos resultados obtidos neste estudo, não deve ser recomendado o consumo do chá preparado a partir das folhas do yacón na medicina popular para o tratamento do diabetes.

7. Referências bibliográficas

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. 1997. **Biologia**Molecular da Célula. 3a. ed. Artes Médicas, Porto Alegre.

Ambrósio, S.R.; Oki, Y.; Heleno, V.C.G.; Chaves, J.S.; Nascimento, P.G.B. D.; Lichston J.E.; Constantino, M. G.; Varanda, E. M.; Da Costa, F. B. 2008. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, 69: 2052-2060.

Baroni, S.; Suzuki-Kemmelmeier, F.; Caparroz-Assef, S.M.; Cuman, R.K.N.; Bersani-Amado, C.A. 2008. Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius*n (yacon) on glycemia in diabetics rats. **Brazilian Journal of Pharmaceuticals Sciences**, 44: 521-530.

Berkemeier, H.; Giessler, A.J. 1987. Thrombosis induction by different carrageenans in rats and mice. **Naturwissenschaften**, 74: 345-346.

Bernfeld, P. 1955. Amylases α e β. **Methods in Enzymology**, 1: 149-154

Bishop, M.L., Duben-Engelkirk, J.L., Fody, E.P., 2000. **Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincot Willians & Wilkins.

Carr, M.E. 2001. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state. **Journal of Diabetes**Complications, 15: 44-54.

Cattell, V.; Smith, J.; Cook, H.T. 1990. Prostaglandin E₁ suppresses macrophage infiltration and ameliorates injury in an experimental model of macrophage-dependent glomerulonephritis. **Clinical and Experimental Immunology**, 79: 260 -265.

Chem, J.H.; Ho, C.T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 2374-2378.

Chen, J.; Muntner, P.; Hamm, L.L.; Fonseca, V.; Batuman, V.; Whelton, P.K.; He, J. 2003. Insulin resistance and risk of chronic renal disease in non diabetics US adults. **Journal of American Society of Nephrology**, 14, 469-477.

Di Rosa, M.; Giroud, J.P.; Willoughby, D.A. 1971. Studies of mediators of the acute inflamatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Journal of Pathology**, 104: 15-29.

Doweiko, J.P; Nompleggi, D.J. 1991. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. **Journal of Parental and Enteral Nutrition**, 15: 207-211.

Dun, M.J. 1984. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and renal function. **Annual Review of Medicine**, 35: 411-428.

Elufioye, T. O.; Alatise, O.I.; Fakoya, F.A.; Agbedahunsi, J.M.; Houghton, P J. 2009. Toxicity studies of *Tithonia diversifolia* A. Gray (Asteraceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 122: 410-415.

Evans, F.J.; Edwards, M.C. 1987. Activity correlations in the phorbol esters series. In jury, S.L.; Reynolds, T.; Cutler, D.F.; Evans, F.J. (eds.) (1987). **The Euphorbiales chemistry, taxonomy and economic botany**. Linnean society, academic Press, London.

FDA. 2005. Guidance for industry estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, disponível em:

http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance s/ucm078932.pdf. Acessado em dezembro de 2007.

Genta, S.B.; Cabrera W.M.; Grau A.; Sánchez, S.S. 2005. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 1657-1665.

Genta, S.B.; Cabrera, W.M.; Mercado, M.I.; Grau, A.; Catalan, C.A.; Sánchez, S.S. 2010. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: constituents of the most active fractions. **Chemico-Biological Interactions**, 185: 143-152.

Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. 2008. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56: 1193-1204.

Gonçalez, E.; Felicio, J.D.; Pinto, M.M.; Rossi, M.H.; Medina, C.; Fernandes, M.J.B.; Simoni, I.C. 2003. Inhibition of aflatoxin production by *Polymnia sonchifolia* and its *in vitro* cytotoxicity. **Archives of the Institute of Biology,** 70: 159-163.

Gosh, S.; May, M.J.; Kopp, E.B. 1998. NF-κB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. **Annual Review of Immunology**, 16: 225-260.

Goto K.; Fukai K.; Hikida J.; Nanjo F.; Hara Y. 1995. Isolation and structural analysis of oligosaccharides from yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 59: 2346-2347.

Grassl, G.A.; Fessele, S.; Merfort, I.; Lindenmeyer, M.; Castro, V.; Murillo, R.; Nelson, P.J.; Autenrieth, I.B. 2005. Sesquiterpene lactones inhibit Yersinia invasion protein-induced IL-8

and MCP-1 production in epithelial cells. **International Journal of Medical Microbiology**. 295: 531-538.

Hecker E. 1968. Cocarcinogenic Principles from the Seed Oil of *Croton tiglium* and from Other Euphorbiaceae. **Cancer Research**, 28: 2338-234.

Huang, M.T.; Smart, R.C.; Wong, C.Q.; Conney, A.H. 1998. Inhibitory effecto of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in moude skin by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Research**, 48: 5941-5946.

Hung, T.M.; Na, M.K.; Thuong, P.T.; Su, N.D.; Sok, D.E.; Song, K.S.; Seong, Y.H.; Bae, K.H., 2006. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall. **Journal of Ethnopharmacology**, 108: 188-192.

Inoue A.; Tamogami S.; Kato H. 1995. Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. **Phytochemistry**, 30: 845-848.

Kandra, L.; Gyémant, G.; Zájácz, A.; Batta, G. 2005. Enzymatic synthesis of a new inhibitor of α-amylases: acarviosinyl-isomaltosyl-spiro-thiohydantoin. **Carbohydrate Research**, 340: 1311-1317.

Kim, H.J.; Lee, Y.S., 2005. Identification of new dicaffeoylquinic acids from *Chrysanthemum morifolium* and their antioxidant activities. **Planta Medica**, 71: 871-876.

Kimura, Y.; Okuda, H. 1987. Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetanins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Natural Products**, 50: 392-399.

Lafay, S.; Gil-Izquierdo, A.; Manach, C.; Morand, C.; Besson, C.; Scalbert, A. 2006. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. **Journal of Nutrition**, 1192-1197.

Lin F., Hasegawa M., Kodama O. 2003. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. **Bioscience Biotechonology and Biochemistry**, 67: 2154-2159.

Merfort I. 2003. *Arnica:* new insights on the molecular mode of action of traditional medicinal plant. **Forschend Komplementarmedizin und Klassische Naturheilkund**, 10: 45-48.

Michaluart, P.; Masferrer J.L.; Carothers A.M., Subbaramaiah, K.; Zweifel B.S.; Koboldt, C.; Mestre, J.R.; Grunberger, D.; Sacks, P.G.; Tananbe, T.; Dannenberg, A.J. 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of ciclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in rat model of inflammation. **Cancer Research**, 59: 2347-2352.

Miura, T.; Itho, Y, Ishida, T. 2004. Hypoglycaemic and hipolipidemic activity of the leaf of *Samallhanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. **Journal of Traditional Medicine**, 21: 275-277.

Miura, T. 2007. Antidiabetic activity of *Fucosporia oblique* and *Smallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. **Journal of Traditional Medicine**, 24: 47-50.

Mujumdar, A.M.; Misar, A.V. 2004. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 90: 11-15.

Muntner, P.; Coresh, J.; Smith, J.C.; Eckfeldt, J.; Klag M.J. 2000. Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. Kidney **International**, 58: 293-301.

Olthof, M.R.; Hollman, P.C.H.; katan, M.B. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, 66-71.

Pak A.; Gonçalez E.; Felício J.D.; Pinto M.M.; Rossi M.H.; Simoni I.C.; Lopes M.N. 2006. Inhibitory activity of compounds isolated from *Polymnia sonchifolia* on aflatoxin production by Aspergillus flavus. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37:199-203.

Pedreschi, R.; Campos, D.; Noratto, G.; Chirinos, R.; Cisneros-Zevallos, L. 2003. Andean yacon roots (Smallanthus sonchifolius Poepp. Endl.) fructooligosaccharides as a potential novel sources prebiotics. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 5278-5284.

Peluso, G.; De Feo, V.; De Simone, F.; Bresciano, E.; Vuotto, M.L., 1995. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. Journal of Natural Products, 58: 639-646.

Pinto, M.M.; Gonçalez, E.; Rossi, M.H.; Felicio, J.D.; Medina C.S.; Fernandes, M.J. B.; Simoni, I.C. 2001. Activity of the aqueous extract from *Polymnia sonchifolia* leaves on growth and production of aflatoxin B1 by Aspergillus flavus. Brazilian Journal of Microbiology, 32: 127-129.

Rao, T. S.; Currie, J. L.; Shaffer, A. F.; Isakson, P. C. 1993. Comparative evaluation of and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal arachidonic acid (AA)inflammation. Inflammation, 17: 723-741.

Rastrelli, L.; Saravia, A.; Hernandez, M.; De Simone, F., 1998. Antiinflammatory activityguided fractionation of *Gnaphalium stramineum*. **Pharmaceutical Biology**, 36: 315-319.

Reigner, B.G.; Blesch, K.S. 2002. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. European Journal of Clinical Pharmacology, 57: 835-845.

Robertson, R.P. 1983. Prostaglandins, glucose homeostasis, and diabetes mellitus. Annual **Review of Medicine**, 34: 1-12.

Rossat, J.; Maillard, M.; nussberger, J.; Brunner, H.R.; burnier, M. 1999. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-deplet subjects. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 66: 76-84.

Tran, P.O.T.; Gleason, C.E.; Poitout, V.; Robertson, R.P. 1999. Prostaglandin E₂ mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1β. **Journal of Biological Chemistry**, 274: 31245-31248.

Salvemini, D.; Wang, Z.Q; Wyatt, P.S.; Bourdon, D.M.; Marino, M.H.; Manning, P.T.; Currie, M.G. 1996. Nitric Oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenaninduced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, 18: 829-838.

Schorr, K.; Da Costa, F.B. 2003. A proposal for chemical characterisation and quality evaluation of botanical raw materials using glandular trichome microsampling of yacón (Polymia sonhifolia, Asteraceae), an Andean medicinal plant. Revista Brasileira de Farmacognosia 13: 1-3.

Schorr, K.; Da Costa, F.B. 2005. Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of Smallanthus sonchifolius (Asteraceae) by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, 16: 161-165.

Schorr, K.; Mefort, I.; Da Costa F.B. 2007. A novel dimeric melampolide and further terpenoids from Smallanthus sonchifolius (Asteraceae) and the inhibition of the transcription factor NF-κB. Natural Products Communication, 2: 367-374.

Schimidt T. 1999. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. Current Organic Chemistry, 3: 577-608.

Siedle, B.; García-Piñeres, A.J.; Murillo, R.; Schulte-Mönting, J.; Castro, V.; Rüngeler, P.; Klaas, C.A.; Da Costa, F.B.; Kisiel, W.; Merfort, I. 2004. Quantitative structure-activity relantionship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-κB. Journal of Medical Chemistry, 47: 6040-6054.

Siebert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Lee, L.; Isakson, P. 1994. Pharmacological and biochemical dmosntration oh the role of ciclooxigenase 2 in inflammation and pain. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 91: 12013-12017.

Siedle, B.; García-Piñeres, A.J.; Murillo, R.; Schulte-Monting, J.; Castro, V.; Rüngeler, P.; Klass, C.A.; Da Costa, F.B.; Kisiel, W.; Merfort, I. 2004. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF-kB. **Journal** of Medicinal Chemistry, 47: 6042-6054.

Simonowska, B.; Vovk, I.; Andrenzek, S.; Valentová, K.; Ulrichová, J. 2003. Investigation of phenolic acids in yacon (Smallanthus sonchifolius) leaves and tubers. Journal of Chromatography A, 1016: 89-98.

Socrates, G. 1994. **Infrared characteristic group frequencies**. 2nd. Wiley, Great Britain.

Sorg, B.; Fiirstenberger, G.; Berry, D. L.; Hecker, E.; Marks, F. 1982. Preparation of retinoic acid esters of phorbol derivatives. **Journal of Lipid Research**, 23: 443-447.

Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Loggia, R. D. 1985. The croton oil ear revisited. **Agents and Actions**, 17: 347-349.

Takenaka, M.; Ono, H. 2003. Novel octulosonic acid derivatives in the composite *Smallanthus sonchifolius*. **Tetrahedron Letters**, 44: 999–1002.

Takenaka, M; Yan, X.; Ono, H.; Yoshida, M.; Nagata, T.; Nakanishi, T. 2003. Caffeic acid derivatives in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, 51: 793-796 793.

Terada, S.; Itoh, K.; Noguchi, N.; Ishida, T. 2009. Alpha-glucosidase inhibitor, inhibitor for blood glucose level elevation and functional food containing tricaffeoylaldaric acid and method for producing tricaffeoylaldaric acid. **United States Patent Application Publication. US 2009/0209649 A1**. Aug. 20, 2009.

Travis, C.C.; White, R.K. 1988. Interspecies scaling of toxicity data. **Risk Analysis**, 8: 119-125.

Valentová, K.; Ulrichová, J. 2003. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* - prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, 147: 119-130.

Valentová, K.; Moncon, A.; Ulrichová, J., 2004. The effect of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts on rat hepatic metabolism. **Cell Biology and Toxicology**, 20: 109-120.

Valentová K., Sersen F., Ulrichová J. 2005. Radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53: 5577-5582.

Wesołowska, A.; Nikiforuk, A.; Michalska, K.; Kisiel, V.; Chojnacka-Wójcik, E., 2006. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. **Journal of Ethnopharmacology,** 107: 254-258.

Willard, M.D., Tvedten, H., Turnwald, G.H., 1994. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 2^a. ed., Philadelfia WB, Saunders.

Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 111: 544-547.

Yan X., Suzuki M., Ohnishi-Kameyama M., Sada Y., Nakanishi T., Nagata T. 1999. Extraction and identification of antioxidants in the roots of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47: 4711-4713.

Yoon, S.H.; Robyt, J.F. study of inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4^{IV} - α -maltohexaosyl and 4^{IV} - α -maltododecaosyl analogues. **Carbohydrate Research**, 338: 1969-1980.