



**VIVIAN DE OLIVEIRA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-DIABÉTICA DE  $\beta$ -  
GLUCANOS OBTIDOS DE *Rhynchelytrum repens*  
(WILLD.) C. E. HUBB. (POACEAE), EM RATOS**

**LAVRAS – MG**

**2010**

**VIVIAN DE OLIVEIRA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-DIABÉTICA DE B-GLUCANOS OBTIDOS DE  
*Rhynchelytrum repens* (WILLD.) C. E. HUBB. (POACEAE), EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Coorientadores

Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

Dr. Marcio Gilberto Zangeronimo

**LAVRAS - MG**

**2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Silva, Vivian de Oliveira.

Atividade anti-diabética de  $\beta$ -glucanos obtidos de  
*Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb (Poaceae), em ratos /  
Vivian de Oliveira Silva. – Lavras : UFLA, 2010.

73 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Raimundo Vicente de Sousa.

Bibliografia.

1. *Diabetes mellitus*. 2. Atividade hipoglicemiante. 3.  $\beta$ -glucano.  
4. Glicemia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD –636.0896462

**VIVIAN DE OLIVEIRA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-DIABÉTICA DE B-GLUCANOS OBTIDOS DE  
*Rhynchelytrum repens* (WILLD.) C. E. HUBB. (POACEAE), EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de julho de 2010.

Dra. Ana Cardoso C. Filha Ferreira de Paula IFMG/Bambuí

Dr. Marcio Gilberto Zangeronimo UFLA

Dr. Luciano José Pereira UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2010**

*Em memória a Ana Pereira de Oliveira, mãe e exemplo  
de vida, sempre presente nos meus pensamentos e em  
meu coração.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus, por me conceder a esperança, a saúde e a perseverança para empreender este trabalho.

À minha mãe Ana Pereira de Oliveira, pelo exemplo de dedicação, força e fé, por ter me ensinado o que é mais precioso na pessoa humana; a educação.

Aos meus irmãos, pessoas que mais amo, pela compreensão, exemplo, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, sem eles nunca teria chegado até aqui.

Aos meus sobrinhos, por fazerem minha vida mais feliz. Amo vocês profundamente.

Ao meu grande amigo Nelson, pelo esclarecimento de inúmeras dúvidas e por me aguentar durante esse período, ouvindo todas as minhas reclamações e desabaços. Obrigada pelo carinho, amizade e conselhos. Você vai morar pra sempre no meu coração.

À minha querida amiga Rojana, pela amizade e carinho e por ter me adotado como uma de suas irmãs. Você faz parte da minha vida, sem você nada disso teria sido possível. Muito obrigada por tudo que você fez por mim.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro sem o qual não poderia ter concluído o mestrado.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa, por ter me aceito como aluna, obrigada por tudo que me possibilitou. Agradeço pelo crescimento profissional e pessoal e espero um dia retribuí-lo de alguma maneira.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Marcio Gilberto Zangeronimo e Profa. Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula pela ajuda, ensinamentos e sugestões e ao Prof. Dr. Luciano José Pereira por aceitar o convite para a participação da banca avaliadora e pela contribuição na melhoria deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA que contribuíram para minha formação acadêmica, especialmente ao Prof. Dr. Luis David Solis Murgas pelo apoio e estímulo.

Ao meu grande amigo Matheus Soares da Silva Ferreira, pelo auxílio na execução dos experimentos, pela colaboração, amizade e pela convivência durante o mestrado.

Ao amigo Willian César Cortez técnico do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, pelos ensinamentos de bancada e pela grande contribuição a este trabalho, e a toda equipe que me auxiliou durante a execução do experimento no laboratório.

À Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da UFLA, ao Laboratório de Patologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, ao Laboratório do Centro de Indexação de Vírus de Minas Gerais Departamento de Fitopatologia da UFLA e ao Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Marcos Aurélio Lopes pelo incentivo e por ter me proporcionado o primeiro contato com o Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

Agradeço a todos que me acompanharam neste período, pois sem vocês a realização deste trabalho não seria possível.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos do  $\beta$ -glucano de *Rhynchelytrum repens*, planta da família Poaceae popularmente utilizada no tratamento do diabetes, na redução da glicemia. A extração dos  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* foi realizada no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da UFLA e no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA. As amostras foram enviadas para a Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências/Departamento de Botânica para caracterização dos  $\beta$ -glucanos, onde se confirmou a presença dos mesmos. Foram realizados três experimentos com ratos normais e diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Os  $\beta$ -glucanos utilizados nos experimentos se referem a fração KOH 4 M rica em  $\beta$ -glucanos. No primeiro experimento foram utilizados 24 ratos Wistar que receberam a dose de 2,5 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano, por via intraperitoneal, durante 21 dias. Ao ser avaliada a glicemia do período total, pode-se observar que não houve diferença entre os animais tratados e não tratados. No segundo experimento foram utilizados 48 ratos Wistar recebendo doses crescentes de 0, 7, 14, 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano, por via intraperitoneal, pelo mesmo período anterior. A dose de 21mg/kg/dia quando utilizada por vinte e um dias proporcionou uma redução ( $P < 0,05$ ) nos níveis glicêmicos. No último experimento 30 ratos Wistar receberam doses de 50, 100, 150 e 200 mg/kg de  $\beta$ -glucano, e a glicemia foi dosada antes da administração do  $\beta$ -glucano e posteriormente a cada seis horas por 24 horas. Todos os tratamentos diferiram ( $P < 0,05$ ) do grupo controle. As quatro doses administradas se mostraram eficientes na redução da glicemia. A dose de 200 mg/kg de  $\beta$ -glucano apresentou a maior redução em relação a glicemia inicial, alcançando um decréscimo de 48,5% em 24 horas. A fração rica em  $\beta$ -glucanos obtidos de *Rhynchelytrum repens* reduz a glicemia de ratos diabéticos.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*. Atividade hipoglicemiante.  $\beta$ -glucano. Glicemia.



## ABSTRACT

The aim of this study was to verify the anti-diabetic activity of  $\beta$ -glucans from *Rhynchelytrum repens* plants (Poaceae), used in traditional and popular medicine for diabetes treatment, on the reduction of blood sugar levels. Extraction was performed at CAPQ (Centro de Análise e Prospecção Química, Departamento de Química, UFLA) and at DMV (Departamento de Medicina Veterinária, UFLA). Samples were sent to USP (Departamento de Botânica, Instituto de Biociências) for the characterization of  $\beta$ -glucans, and their presence was confirmed. Three experiments were performed with normal rats and streptozotocin-induced diabetic rats.  $\beta$ -glucans used are referred to the KOH 4M rich fraction. In the first trial, 24 Wistar rats received 2.5 mg/kg/day of  $\beta$ -glucan, intraperitoneally, for 21 days. There were no differences in blood glucose levels between treated and non-treated animals. In the second trial, 48 Wistar rats received increasing dosages of 0, 7, 14 and 21 mg/kg/day of  $\beta$ -glucan, using the same procedure and time lag described above. Glycemic levels were reduced with 21 mg/kg/day for 21 days. In the last experiment 30 Wistar rats were treated with higher dosages of  $\beta$ -glucans (50, 100, 150 and 200 mg/kg/day), and glucose levels were measured before and each 6 hours after administration, until 24 hours. All treatments differed from the control. All dosages used were efficient, but the dose of 200 mg/kg/day resulted in lesser blood glucose in relation to initial levels, reaching a 48.5% decrease in 24 hours. The  $\beta$ -glucan from *Rhynchelytrum repens* is able to cause a decrease in blood glucose levels of diabetic rats.

Keywords: *Diabetes mellitus*. Hypoglycemic activity.  $\beta$ -glucan. Glicemic.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
2.1	<i>Diabetes Mellitus</i> .....	13
2.2	Insulina e peptídeo C .....	14
2.3	Tratamento medicamentoso do diabetes mellitus .....	17
2.4	<i>Diabetes mellitus</i> experimental.....	19
2.5	Características gerais do <i>Rhynchelytrum repens</i> .....	19
2.6	$\beta$ -glucanos .....	21
2.7	Atividade biológica dos $\beta$ -glucanos .....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1	Extração e caracterização do extrato de <i>Rhynchelytrum repens</i> .....	26
3.1.1	Preparo das amostras .....	26
3.1.2	Caracterização dos $\beta$ -glucanos .....	27
3.2	Ensaio biológicos .....	28
3.2.1	Experimento 1 .....	28
3.2.1.1	Animais e delineamentos experimental.....	29
3.2.1.2	Análises bioquímicas.....	30
3.2.1.3	Análise estatística .....	30
3.2.2	Experimento 2 .....	30
3.2.2.1	Animais e delineamento experimental .....	30
3.2.2.2	Análises bioquímicas.....	31
3.2.2.3	Análises histopatológicas .....	31
3.2.2.4	Análise estatística.....	32
3.2.3	Experimento 3 .....	32
3.2.3.1	Animais e delineamento experimental .....	32
3.2.3.2	Análises bioquímicas.....	33
3.2.3.3	Análise estatística .....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	Caracterização de $\beta$ -glucanos no extrato de <i>Rhynchelytrum repens</i> ..	34
4.2	Ensaio biológicos .....	37
4.2.1	Experimento 1 .....	37
4.2.1.1	Glicemia .....	37
4.2.1.2	Peso corporal.....	39
4.2.1.3	Consumo de ração.....	40
4.2.1.4	Ingestão de água e volume urinário .....	41
4.2.2	Experimento 2 .....	42
4.2.2.1	Glicemia .....	42
4.2.2.2	Peso corporal.....	44
4.2.2.3	Consumo de ração, ingestão de água e volume urinário .....	45
4.2.2.4	Insulina e peptídeo C .....	49

<b>4.2.2.5</b>	<b>Análises histopatológicas</b> .....	51
<b>4.2.3</b>	<b>Experimento 3</b> .....	54
<b>4.2.3.1</b>	<b>Glicemia</b> .....	54
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>ANEXOS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

A importância do *diabetes mellitus* como um problema de saúde pública está no fato de que a maioria das complicações crônicas da doença é altamente incapacitante para a realização das atividades diárias e produtivas, além de comprometer a qualidade de vida. Acrescenta-se a isso, o fato de o tratamento das mesmas que é extremamente oneroso para o sistema de saúde. Ao longo das últimas décadas, inúmeras pesquisas objetivando melhor controle metabólico têm sido realizadas e novas tecnologias incorporadas ao tratamento desta doença.

O desenvolvimento de produtos que possibilitem o surgimento de novas alternativas para o tratamento do diabetes, sobretudo do tipo II, é relevante, principalmente tendo-se em vista a prevalência desta enfermidade em todo o mundo. Além de se tratar de uma doença de caráter crônico, a mesma predispõe os pacientes a uma série de outras enfermidades de tratamento complexo e dispendioso.

Vários fitoterápicos são utilizados de modo empírico, sem comprovação científica sobre substâncias ativas e sem comprovação de eficácia terapêutica, de acordo com os conhecimentos populares. Como exemplo dessa prática, pode-se citar a espécie *Rhynchelytrum repens*, conhecida como capim favorito, uma gramínea cosmopolita, encontrada em regiões tropicais.

Recentemente foi comprovada a atividade antidiabética do capim-favorito (*Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae), cuja infusão é usada popularmente no controle da glicemia em indivíduos diabéticos. Esta atividade foi atribuída à presença de  $\beta$ -glucanos, polissacarídeos solúveis constituintes da parede celular de gramíneas, cereais e fungos.

Considerando a importância da descoberta de novos fármacos que sejam seguros, mais acessíveis e que contribuam com a qualidade de vida da

população, o presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos dos  $\beta$ -glucanos extraídos de *Rhynchelytrum repens* reduzem os níveis de glicose do sangue de ratos diabéticos melhorando os sinais associados ao diabetes.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Diabetes mellitus*

O *diabetes mellitus* é uma doença decorrente de problemas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (DE FRONZO, 2004) e representa uma complexa desordem metabólica em virtude da deficiência total ou parcial da produção e secreção de insulina pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas (LERMEN et al., 2005; QUEIROGA et al., 2006).

De acordo com Lermen et al. (2005) esta alteração metabólica crônica não transmissível acomete, atualmente, de 7 a 8% da população adulta mundial, tendo sido responsável por 987 mil mortes no ano de 2002, segundo a Organização Mundial de Saúde, ou seja, 1,7% da mortalidade geral naquele ano (CARDOSO et al., 2007; ROGLIC et al., 2005). Atualmente, o diabetes acomete aproximadamente 246 milhões de indivíduos em todo o mundo, dos quais 12 milhões são brasileiros (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF, 2010).

Existem dois tipos de *diabetes mellitus*: *diabetes mellitus* tipo 1, onde se verifica a deficiência de insulina decorrente da destruição auto-imune ou desgaste das células  $\beta$  do pâncreas. Em geral, os pacientes são jovens e não obesos quando os sintomas aparecem pela primeira vez. Nesses pacientes, o tratamento é feito utilizando-se insulina por via subcutânea; e *diabetes mellitus* tipo 2, na qual ocorre resistência à insulina. Normalmente, os pacientes são obesos e a doença aparece na vida adulta. Os agentes hipoglicemiantes orais e a insulina tornam-se frequentemente necessários (HARDMAN; MOLINOFF; GILMAN, 1996).

Os sintomas mais frequentes do diabetes são: poliúria, polidipsia, glicosúria, polifagia, alterações visuais, lesões na pele, distúrbios cardíacos e

renais. Existem vários fatores predisponentes, como obesidade, hereditariedade, hipertensão, níveis plasmáticos altos de colesterol e triglicérides, idade acima de 40 anos, medicamentos com corticoides e estresse emocional (PRADO; RAMOS; VALLE, 1999; RANG; DALE; RITTER, 2001).

Alterações no metabolismo de lipídeos e proteínas ocorrem no diabetes. As proteínas sofrem uma maior degradação e a síntese é reduzida. Os lipídeos são degradados em acetil-CoA e, na ausência de metabolismo aeróbico dos carboidratos, a acetil-CoA é convertida anaerobicamente em acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato e acetona. Em consequência destes distúrbios metabólicos, frequentemente surgem diversas complicações no decorrer dos anos (HARDMAN; MOLINOFF; GILMAN, 1996; RANG; DALE; RITTER, 2001).

## **2.2 Insulina e peptídeo C**

A insulina é um hormônio peptídico produzido pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas e exerce um papel fundamental no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (NELSON; COX, 2000).

Sua forma madura é composta por duas cadeias peptídicas (cadeias A e B) que estão ligadas entre si por duas pontes dissulfeto. A insulina é sintetizada sob a forma inativa de pré-pro-insulina, que apresenta em sua porção N-terminal uma sequência de sinalização. Quando esta sequência é clivada, a partir da ação de proteases, há formação de três pontes dissulfeto, dando origem a pró-insulina. Quando há estímulo para secreção de insulina, enzimas específicas denominadas pró-hormônios convertases 1, 2 e 3, promovem a hidrólise de duas ligações peptídicas na cadeia da pró-insulina, dando origem à insulina madura e ao peptídeo C (EL-BACHA, 2002; NELSON; COX, 2000).

Esse hormônio é necessário para o transporte transmembrana de glicose e aminoácidos, para a formação de glicogênio no fígado e músculos esqueléticos

e para promover a conversão da glicose em triglicerídios e a síntese de ácidos nucléicos e proteínas, facilitando a captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo reduzindo assim os níveis glicêmicos (COLLINS; COTRAN; KUMAR, 2000).

O receptor da insulina faz parte da classe de receptores que estimulam atividade da proteína tirosina quinase, a qual provoca todo o processo de cascata de fosforilação. O receptor é composto por duas subunidades  $\alpha$  (localizadas na porção extracelular e responsáveis pela ligação da insulina ao receptor) e duas  $\beta$  (encontradas na porção intracelular e responsáveis pela atividade tirosina quinase) (EL-BACHA, 2002).

O processo de sinalização da insulina é iniciado com a ligação da insulina às subunidades  $\alpha$  do receptor que estão localizadas inteiramente no exterior da célula. A partir daí, acontece auto fosforilação cruzada em três principais sítios de tirosina quinase (posições 1146, 1150 e 1151), localizados nas subunidades  $\beta$  do receptor, que alteram sua conformação possibilitando acesso ao ATP e substratos (WHITE, 1997). Os substratos para receptor de insulina (IRS-1, -2, -3 e -4) fazem parte de uma família de proteínas que atuam como mediadores entre receptor e moléculas sinalizadoras, funcionando como plataforma fornecedora de grupamentos fosfato. Outras várias proteínas são fosforiladas como a fosfatidilinositol-3-kinase (PI-3k), a fosfotirosina fosfatase (PTP1D ou Syp) e a proteína adaptadora Grb2 (MAASSEN; OWENS, 1997).

O grande número de estudos sobre a insulina se justifica pela participação inequívoca da mesma na patogênese do diabetes mellitus, cuja prevalência é muito alta em todas as partes do mundo acometendo mais de 246 milhões de pessoas em todos os continentes (EL-BACHA, 2002; IDF, 2010).

A avaliação da capacidade de secreção de insulina é uma ferramenta fundamental para pesquisas que buscam o entendimento da história natural do *diabetes mellitus* e do impacto de novas terapias na prevenção secundária da



doença. Atualmente, a avaliação da capacidade de secreção de insulina, para pacientes com diabetes mellitus, é indicada nos casos em que a diferenciação entre *diabetes mellitus* tipo 1 e *diabetes mellitus* tipo 2 é difícil apenas com base na apresentação clínica, como exame complementar para auxiliar a classificação adequada da doença (RODAKCI; MILECH; OLIVEIRA, 2008).

Tradicionalmente, o *diabetes mellitus* tipo 1 é considerado como uma doença caracterizada por uma ausência completa de células- $\beta$  e falência total da secreção de insulina. Entretanto, estudos clínicos e anatomopatológicos, especialmente das duas últimas décadas, têm chamado atenção para a existência de células pancreáticas residuais contendo insulina, assim como manutenção de alguma capacidade secretória em uma proporção significativa dos pacientes, tanto com doença recém-diagnosticada quanto de longa duração (LOHR; KLOPPEL, 1987).

Uma forma de avaliar a capacidade de secreção da célula- $\beta$  é quantificar o peptídeo C sérico. Este é um peptídeo que conecta as cadeias A e B na pró-insulina e é removido para a ativação do hormônio em sua forma biologicamente ativa nos grânulos secretórios das ilhotas pancreáticas. Após a clivagem da pró-insulina, o peptídeo C intacto permanece armazenado com a insulina nesses grânulos e é subsequentemente secretado com a insulina, em quantidades equimolares. Sendo assim, o peptídeo C pode ser considerado como um marcador independente da secreção de insulina (PALMER, et al., 2004).

A dosagem de peptídeo C tem algumas vantagens em relação à determinação da insulina plasmática na avaliação funcional da célula- $\beta$ . Além de ter meia-vida mais longa (30 minutos), o que implica menor flutuação de níveis séricos, não sofre metabolização hepática significativa e possui *clearance* mais previsível. Por esses motivos, a dosagem de peptídeo C tem sido considerada como o método mais adequado, aceito e clinicamente validado para avaliação da função das células- $\beta$  pancreáticas (RODAKCI; MILECH; OLIVEIRA, 2008).

Alguns estudos indicam que o peptídeo C e a insulina possam interagir sinergicamente nas vias de sinalização da insulina. Há evidências de que o peptídeo C possa atenuar a atividade da proteína tirosina fosfatase, uma enzima que influencia a sinalização de insulina por desfosforilação de seu receptor. O peptídeo C se mostrou capaz de simular os efeitos da insulina em mioblastos (células formadoras de músculos) e células de neuroblastoma humano, ativando tanto o receptor de insulina (tirosina quinase) quanto alguns passos da sinalização da insulina (GRUNBERGER et al., 2001; LI; ZHANG; SIMA, 2003).

Pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 podem apresentar alguma secreção residual de insulina por longos períodos. Os fatores implicados nesse fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos. Há evidências de que a manutenção dessa função secretora possa trazer alguns benefícios, como redução do risco de complicações crônicas da doença, maior facilidade em atingir o controle metabólico adequado e menor frequência de hipoglicemias graves. O peptídeo C, antes considerado apenas um marcador da função da célula- $\beta$ , pode ter atividade biológica e contribuir para esses efeitos. Entretanto, estudos prospectivos direcionados especificamente à avaliação da utilidade da preservação da secreção residual de insulina e/ou peptídeo C ainda são necessários (RODAKCI; MILECH; OLIVEIRA, 2008).

### **2.3 Tratamento medicamentoso do *diabetes mellitus***

O tipo de diabetes afetará o tratamento que o paciente recebe, mas tanto o tipo 1 quanto o tipo 2 requer um plano de tratamento que mantenha os níveis de glicose no sangue regulares. A prioridade no tratamento do diabetes é devolver ao paciente seu equilíbrio metabólico e mantê-lo assim, propiciando um estado o mais próximo possível da fisiologia normal do organismo, o que

não é tarefa fácil. Isto implica em conscientizar o paciente e a família sobre o significado do bom controle metabólico, conduzindo-o também a um bem estar físico, psíquico e social. Uma vez que os níveis de açúcar no sangue estejam sob controle com injeções de insulina, dieta ou medicamentos, uma pessoa com diabetes geralmente pode levar uma vida relativamente normal (MALERBI et al., 2006; PIRES; CHACRA, 2008).

O tratamento do diabetes tipo 1 consiste de terapia médica nutricional, atividade física e insulino-terapia. Os tipos de insulina mais utilizados são: insulinas de ação rápida (regular) que tem início de ação em 30 minutos, pico de ação em 120 minutos e término de ação em 4 a 6 horas; insulinas de ação ultra-rápida a qual tem absorção mais rápida que a insulina regular, pico mais elevado e tempo de ação mais curto, de 3 a 4 horas; insulinas de ação intermediária ou lenta que tem início de ação em 2 a 4 horas, pico de ação entre 6 e 12 horas e duração de ação de 16 a 20 horas e; as insulinas de ação prolongada ou ultra lenta, estas últimas são pouco utilizadas, tendo indicação maior para os pacientes que metabolizam a insulina mais rapidamente. As ultra lentas tem início de ação em 6 a 10 horas, pico de ação em 10 a 16 horas e duração de ação de 20 a 24 horas. O tratamento tem melhores resultados quando proporcionados por uma equipe multidisciplinar, da qual o paciente precisa ser membro ativo e principal (EL-BACHA, 2002; MALERBI et al., 2006; PIRES; CHACRA, 2008).

O tratamento medicamentoso do diabetes tipo 2 deve ser iniciado quando as recomendações nutricionais e de atividade física não forem eficazes para manter os níveis de HbA1c (hemoglobina glicosilada) inferiores a 7,0 %, mesmo em pacientes sem queixas, com boa qualidade de vida e aderentes às orientações nutricionais e de atividade física. Atualmente, existem cinco classes distintas de agentes orais, redutores da glicose sanguínea, disponíveis comercialmente no Brasil, sendo elas: sulfanilureias e glitinidas (medicamentos que estimulam a secreção de insulina), biguanidas e tiazolinedionas

(medicamentos que diminuem a resistência à insulina) e os inibidores da alfa-glicosidase ou acarbose (medicamentos que diminuem a absorção intestinal de glicose). A escolha deve levar em consideração aspectos individuais do paciente, como idade, peso, níveis da glicose sanguínea (jejum e pós-prandial) e aspectos clínicos indicativos de resistência ou deficiência insulínica como mecanismo fisiopatológico predominante (DE FRONZO, 1999; INZUCCHI, 2002).

Assim como acontece no tratamento de outras doenças, plantas consideradas medicinais são utilizadas popularmente para o controle do diabetes, sendo que muitas delas já tiveram seu efeito hipoglicemiante cientificamente comprovado (BARBOSA-FILHO et al., 2005).

#### **2.4 Diabetes mellitus experimental**

Os modelos mais utilizados *in vivo* para o estudo do diabetes são roedores tratados com aloxano ou estreptozotocinas (MARLES; FARNSWORTH, 1995). A estreptozotocina é um glicosídeo nitrosúrea natural isolado do *Streptomyces achromogenes*. Esta substância estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disfunção das células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Este xenobiótico tem sido usado para induzir o diabetes com concomitante deficiência de insulina. Uma dose simples de 40 a 80 mg/kg em ratos pode produzir um modelo experimental do diabetes tipo II (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

#### **2.5 Características gerais do *Rhynchelytrum repens***

Uma ampla variedade de plantas tem sido utilizada tradicionalmente e/ou experimentalmente no tratamento de diabetes mellitus, sendo que o estudo destas espécies poderá resultar em novas fontes potenciais de drogas antidiabéticas

(MARLES; FARNSWORTH, 1995). A atividade hipoglicemiante tem sido relatada há muitos anos em diversas plantas da família *Poaceae* (MARLES; FARNSWORTH, 1995; TAKAHASHI; KONNO; HIKINO, 1985), porém, poucos estudos foram realizados até o momento com *Rhynchelytrum repens*, cuja infusão é usada popularmente no controle dos níveis de glicose sanguínea em indivíduos diabéticos (DE PAULA et al., 2005; SOUZA; DE PAULA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2004). Esta atividade foi atribuída à presença de  $\beta$ -glucanos, polissacarídeos solúveis constituintes da parede celular de gramíneas, grão de cereais e fungos (CARPITA, 1996; DE PAULA et al., 2005).

O *Rhynchelytrum repens* é uma gramínea cosmopolita, encontrada em regiões tropicais e com alto grau de adaptação a solos de baixa fertilidade natural e umidade (FILGUEIRAS, 1991). Conhecido popularmente como capim-favorito, capim-rosado ou capim-natal (LORENZI, 2000), o *Rhynchelytrum repens* é uma planta anual, herbácea, originária da África do Sul e introduzida no país por volta de 1930. Desde então, tem sido facilmente encontrada em áreas abertas e ao longo de rodovias (DE PAULA et al., 2005; LORENZI, 2000).

O capim-favorito tem sido popularmente utilizado no tratamento do diabetes (DE PAULA, 2002; SOUZA; DE PAULA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2004). Com base nestas informações, infusões de *Rhynchelytrum repens* foram avaliadas quanto à presença de  $\beta$ -glucanos e quanto à sua ação hipoglicêmica. Os resultados indicaram que os  $\beta$ -glucanos estão presentes na decocção e que a fração rica em  $\beta$ -glucanos do extrato de *Rhynchelytrum repens* provocou uma diminuição de 40% nos níveis de glicose plasmática após quatro horas de sua administração a ratos diabéticos (DE PAULA et al., 2005).

De maneira geral, extratos aquosos de diversas plantas têm sido utilizados no tratamento de diabetes em diversos países, porém, Pepato et al. (1993) ressaltaram a importância de experimentos com frações parcialmente purificadas

e caracterizadas, visando elucidar quais os componentes do extrato possuem atividade hipoglicemiante e o possível mecanismo de ação destes compostos.

## 2.6 $\beta$ -glucanos

As paredes celulares das plantas são complexas, compostas predominantemente de carboidratos com menores quantidades de proteínas e ácidos fenólicos. A fração de carboidratos consiste de microfibrilas de celulose que são insolúveis e nutricionalmente inertes e uma fração principal que consiste primariamente de  $\beta$ -glucano e glucoronoarabinoxilano (TAVERNARI et al., 2008).

Os glucanos de ligação mista chamados  $\beta$ -glucanos são carboidratos de parede celular encontrados predominantemente em gramíneas (*Poaceae*) e grãos de cereais (CARPITA, 1996). São polímeros lineares formados por unidades de glicose unidas entre si por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) em proporções definidas (Figura 1) (FUJITA; FIGUEROA, 2003; SILVA; AIDAR; BUCKERIDGE et al., 2006).

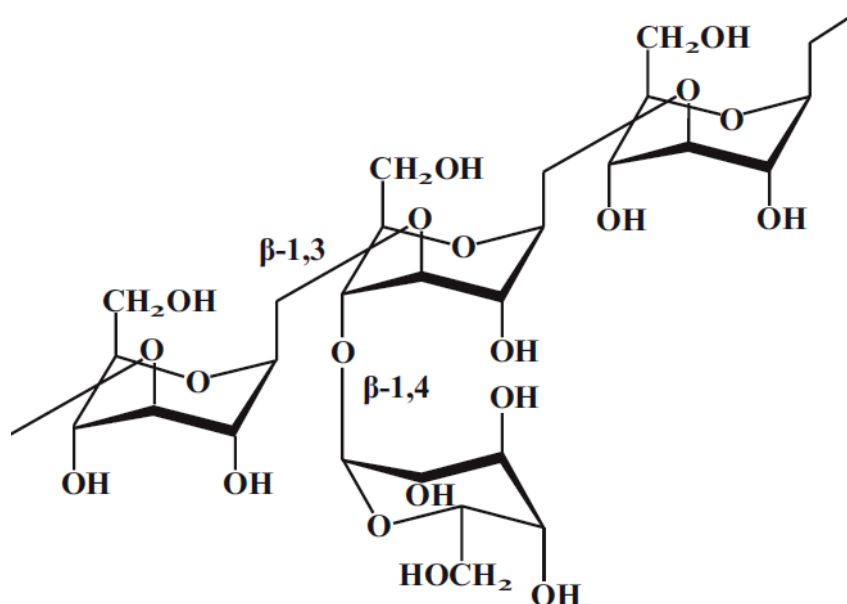


Figura 1 Estrutura dos  $\beta$ -glucanos presentes em Poaceae  
 Fonte Adaptado de Staudte et al. (1985)

Os  $\beta$ -glucanos são sintetizados em células em divisão, mas acumulam-se especificamente durante o alongamento celular (CARPITA; GIBEUT, 1991). Eles são abundantes em paredes celulares de células endospermicas de sementes de gramíneas e podem compor até 70% desses tecidos (FINCHER; STONE, 1986). Em plântulas de milho, a quantidade de  $\beta$ -glucanos aumenta durante a expansão dos cotilédones e das folhas (CARPITA, 1984) e decresce apenas quando o crescimento cessa (CARPITA; KANABUS, 1988). Acredita-se que em células meristemáticas esses polissacarídeos sejam raros, mas em paredes de células em alongamento aparecem em grandes quantidades, coincidindo com a razão máxima de alongamento (KIM; OLEK; CARPITA, 2000).

A compreensão de aspectos da biossíntese e degradação dos  $\beta$ -glucanos durante o crescimento e desenvolvimento de plantas, bem como de suas variações conforme o estágio fisiológico, podem ser de grande valia em

aplicações biotecnológicas. Neste sentido, os  $\beta$ -glucanos têm gerado interesse econômico devido às respostas fisiológicas que produzem como fibra dietética, pois aumentam a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose (YOKOYAMA et al., 1997).

Esses carboidratos estruturais são extensivamente utilizados na alimentação humana e animal e também são importantes fontes de matéria prima para diversos produtos industrializados e para a indústria farmacêutica.

Os efeitos fisiológicos dos alimentos ricos em fibras têm sido alvo de muitos estudos. Isto chama a atenção da comunidade médica e desperta interesse econômico, estimulando a pesquisa sobre a utilização de fontes de  $\beta$ -glucanos na composição de farinhas, cereais matinais, massas de macarrão, pães e bolinhos, bem como em derivados de leite e de carne (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007; SKENDI; PAPAGEORGIOU; BILIADERIS, 2009).

## **2.7 Atividade biológica dos $\beta$ -glucanos**

Os efeitos dos  $\beta$ -glucanos em reduzir a glicemia e nos níveis de secreção de insulina, têm sido relacionados à propriedade deste polissacarídeo de induzir alta viscosidade quando em solução, formando uma camada gelatinosa. Esta camada resiste aos efeitos convectivos das contrações intestinais, diminuindo a absorção de açúcar pelos enterócitos (DE PAULA et al., 2005; MÄLKKY, 2001; MARCONI; GRAZIANO; CUBADDA, 2000). A redução da glicose e dos níveis de insulina após as refeições é dependente tanto do peso molecular do  $\beta$ -glucano quanto da dose ingerida (DE PAULA, 2002).

Estudos apontam ainda que os  $\beta$ -glucanos aumentam a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (YOKOYAMA et al., 1997) e destacam o papel dos  $\beta$ -glucanos na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares e de



*diabetes mellitus* (DE PAULA et al., 2005; EHRENBERGEROVÁ et al., 2008; NILSSON et al., 2006; PICK et al., 1998; YOKOYAMA et al., 1997).

Os  $\beta$ -glucanos são responsáveis por modificações nas propriedades físico-químicas da digesta, alterando a absorção de diferentes nutrientes no trato digestório, incluindo carboidratos e lipídeos oriundos da alimentação. Assim, os  $\beta$ -glucanos têm reconhecida ação na redução dos níveis de colesterol e da glicemia após as refeições quando ingeridos (MÄLKKY, 2001).

As fibras solúveis podem aumentar o bolo fecal e aliviar a constipação intestinal (CAVALLERO et al., 2002; LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007; MÄLKKY, 2001; MÄLKKY; VIRTANEN, 2001), uma vez que o gel viscoso formado no intestino age como uma peneira molecular através da qual as grandes moléculas passam rapidamente, enquanto as moléculas menores são retidas nos poros, retardando a digestão e a absorção de diversos nutrientes (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007). A ingestão de fibras solúveis parece estar relacionada à sensação de saciedade e à perda de peso, devido ao retardamento do esvaziamento gástrico, com consequente redução na velocidade de ingestão de alimento. Ocorre redução dos níveis plasmáticos de glicose e de insulina, elevação dos níveis de colecistoquinina, produção de gás e de ácidos graxos de cadeias curtas pela fermentação das fibras no cólon (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007; MÄLKKY, 2001; MÄLKKY; VIRTANEN, 2001; SALGADO et al., 2005).

Existem também evidências de que os  $\beta$ -glucanos atuem em outras frentes, combatendo o desenvolvimento de câncer de cólon (SILVA; AIDAR; BUCKERIDGE et al., 2006), favorecendo a formação de colágeno e a eliminação de rugas (AGÜERO et al., 2006), contribuindo para a atividade antígeno-tóxica (ANGELI et al., 2009) e estimulando o sistema imunológico de mamíferos (LAZARIDOU; BILIADERIS, 2007).

O extrato aquoso de *Rhynchelytrum repens* contendo  $\beta$ -glucano administrado por via oral em animais diabéticos quando comparado a animais não tratados proporcionou uma redução de cerca de 30% nos níveis de glicose no sangue (DE PAULA; SOUSA; FIGUEIREDO-RIBEIRO, 2006). Da mesma forma, estudos com  $\beta$ -glucanos purificados de *Rhynchelytrum repens*, administrados por via intraperitoneal, demonstram uma redução de até 40% nos níveis de glicose sangüínea de animais diabéticos em comparação aos diabéticos não tratados (DE PAULA et al., 2005). Os efeitos descritos por De Paula et al. (2005) com  $\beta$ -glucanos purificados duraram cerca de 24 horas, ao passo que uma preparação de  $\beta$ -glucanos de cevada utilizado para fins de comparação proporcionou efeito por 6 horas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Extração e caracterização do extrato de *Rhynchelytrum repens*

Plantas de *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb. (Poaceae) foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA) na cidade de Lavras (latitude: -21 °14'43", longitude: 44 °59'59"; altitude: 919 metros; temperatura média anual: 19,4 °C; precipitação: 1.530 mm/ano ) e na cidade de Ribeirão Vermelho (latitude: -21 °11'26", longitude: 45 °03'43"; altitude: 808 metros; temperatura média anual: 19,3 °C; precipitação: 1.623 mm/ano) e submetidas à extração e fracionamento dos carboidratos da parede celular.

##### 3.1.1 Preparo das amostras

A extração dos  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* foi realizada no Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química da UFLA e no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, conforme procedimento descrito por De Paula et al. (2005) resumidamente apresentado a seguir.

Da parte aérea de *Rhynchelytrum repens* foram separados os tecidos da lâmina foliar, bainha, caule e folhas jovens. Esse material vegetal fresco foi macerado em gral com tampão fosfato de sódio 0,5 M por três vezes a frio. Após cada maceração, o resíduo foi filtrado em náilon e a fração líquida descartada. Depois de macerados com o tampão fosfato de sódio 0,5 M e filtrados, o mesmo procedimento foi repetido utilizando-se água destilada no lugar do tampão por mais três vezes. O resíduo dessas extrações permaneceu durante 15 horas em clorofórmio:metanol 1:1(v/v). Em seguida, foi filtrado em náilon, o filtrado descartado e o resíduo lavado e filtrado respectivamente com metanol, acetona e

éter. Após essas lavagens, o resíduo foi liofilizado. Os procedimentos citados acima foram realizados para a eliminação de clorofilas e lipídeos, entre outros compostos, para a obtenção das paredes celulares.

Após a liofilização as paredes celulares foram reduzidas a pequenos fragmentos, sendo os diferentes tecidos de *Rhynchelytrum repens* extraídos sequencialmente com oxalato de amônio 0,5M a pH 7,0, KOH 0,1M, KOH 1M e KOH 4M à temperatura ambiente, sob atmosfera de nitrogênio, com agitação contínua. Todas as extrações foram realizadas por uma hora, com uma repetição por mais uma hora em cada solução, exceto para a última extração com KOH 4M, que foi realizada por 15 horas. Após cada extração, o material foi filtrado em náilon e o resíduo foi submetido a nova extração. As frações extraídas nas soluções básicas foram acidificadas com ácido acético glacial até atingir pH 5,0. As frações de KOH 4M resultantes foram dialisadas exaustivamente em água destilada em membranas SIGMA - PM>12000, com agitação contínua a 5 °C e depois congeladas e liofilizadas.

Os extratos provenientes da extração com oxalato de amônio correspondem a fração pécica e aqueles de KOH 4M às hemiceluloses, que incluem os glucanos de ligação mista (CARPITA, 1984).

### **3.1.2 Caracterização dos $\beta$ -glucanos**

Após a extração dos  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* as amostras foram enviadas para a Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências/Departamento de Botânica para caracterização química.

A análise dos monossacarídeos e sua proporção nas amostras foram realizadas em cromatógrafo DIONEX modelo DX500-ED 40 equipado com detector de pulso amperométrico PAD, em coluna Carbo PAC PA10, em um sistema de eluição com hidróxido de sódio 14 mM, modo isocrático, com um

fluxo de  $0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ , sendo o tempo de corrida de 40 min, com uso de amostrador automático.

Para a detecção de  $\beta$ -glucanos, alíquotas de 1 mg da fração de KOH 4M de *Rhynchelytrum repens* foram dissolvidas em 100  $\mu\text{L}$  de água e fervidas por três minutos. Após o esfriamento, foram adicionados 0,5  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de amônio 1M e 20  $\mu\text{L}$  da preparação da enzima endo-  $\beta$ -glucanase de *Bacillus subtilis*. A mistura foi incubada a  $37^\circ \text{C}$  por três horas em banho-maria e a reação foi paralisada através de fervura por 3 min.

Os oligômeros, produtos da digestão “in vitro”, foram separados através de análises por HPAEC-PAD em coluna de troca aniônica Carbo-Pac PA10 equilibrada com 0,5M de NaOH e eluída com gradiente linear de acetato de sódio 0,5M em NaOH 0,5M, como descrito por Gibeaut e Carpita (1993).

### **3.2 Ensaios biológicos**

Foram realizados três experimentos com ratos normais e diabéticos induzidos pela estreptozotocina. Os  $\beta$ -glucanos utilizados nos experimentos se referem a fração KOH 4 M rica em  $\beta$ -glucanos.

#### **3.2.1 Experimento 1**

Foi realizado um experimento com dose única de 2,5 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano extraído de plantas de *Rhynchelytrum repens*, aplicado por via intraperitoneal, durante 21 dias.

### 3.2.1.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 24 ratos Wistar (12 machos e 12 fêmeas) com peso de  $95,27 \pm 10,87$  g provenientes do biotério do Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso (sexo e peso dos animais) em esquema fatorial 2x2 (diabéticos ou não, tratados e não tratados com  $\beta$ -glucano) com parcelas subdivididas no tempo, com seis repetições. Cada parcela foi representada por um animal. Os valores de glicemia foram obtidos ao longo do tempo (dias 1, 5, 9, 13, 17 e 21).

Quarenta e oito horas antes do experimento, seis machos e seis fêmeas foram induzidos ao *diabetes mellitus* experimental por meio de injeção intraperitoneal de 80 mg/kg de estreptozotocina. O período experimental teve duração de 21 dias.

A solução de  $\beta$ -glucano foi preparada na concentração de 0,25% em água destilada. Os animais receberam os respectivos tratamentos por via intraperitoneal, uma vez ao dia, pela manhã (11 horas).

Os animais foram mantidos em ambiente controlado com 12 horas claro/12 horas escuro à temperatura de 20 ° a 22 °C. Os mesmos tiveram acesso à água e ração comercial *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais para aferição do volume urinário, do consumo de ração e do consumo de água diários. O consumo de alimento, o consumo de água e o volume urinário foram obtidos diariamente de forma direta por pesagem e medidas de volume.

### **3.2.1.2 Análises bioquímicas**

Nos dias 1, 5, 9, 13, 17 e 21 do experimento foram coletadas amostras sanguíneas através da amputação na ponta da cauda para mensuração da glicemia que foi feita com glicosímetro Accu-Chek® Advantage II da marca Roche, sendo sua média comparada ao final do experimento.

### **3.2.1.3 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância após sua transformação (raiz quadrada) para a obtenção da normalidade, sendo as médias de cada fator comparadas pelo teste F. Para as análises estatísticas, foi utilizado o pacote estatístico Statistical Analysis System, SAS (1996).

## **3.2.2 Experimento 2**

Foi realizado um experimento com doses crescentes de 0, 7, 14 e 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano extraído de plantas de *Rhynchelytrum repens*, aplicado por via intraperitoneal, durante 21 dias.

### **3.2.2.1 Animais e delineamento experimental**

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, com peso de  $168,17 \pm 33,79$ g provenientes do Biotério do Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Foi adotado um delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial 4x2 (quatro doses do extrato - 0, 7, 14 e 21 mg/kg/dia - e dois

estados metabólicos - diabéticos e não diabéticos) com parcela subdividida no tempo (7, 14 e 21 dias), com seis repetições.

Metade dos animais foi induzida ao *diabetes mellitus* experimental por meio de injeção intraperitoneal de 80 mg/kg de estreptozotocina administrada 48 horas antes do início do experimento.

As soluções de  $\beta$ -glucano foram preparadas nas concentrações de 0,7%, 1,4% e 2,1% em água destilada. A administração dos tratamentos foi feita por via intraperitoneal, uma vez ao dia, pela manhã.

As condições experimentais foram as mesmas utilizadas no experimento anterior. O consumo de alimento, o consumo de água e o volume urinário foram obtidos diariamente de forma direta por pesagem e medidas de volume.

### **3.2.2.2 Análises bioquímicas**

Nos dias 0, 7, 14 e 21 do experimento foram coletadas amostras sanguíneas através da amputação da ponta da cauda para mensuração da glicemia que foi feita com glicosímetro Accu-Chek<sup>®</sup> Advantage II da marca Roche.

No último dia do experimento foram coletadas amostras sanguíneas através de punção cardíaca para determinação das concentrações plasmáticas de insulina e peptídeo C por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se kit comercial da marca Milipore<sup>®</sup>. Para este procedimento, os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de tiopental sódico.

### **3.2.2.3 Análises histopatológicas**

Após punção cardíaca, os animais foram sacrificados e submetidos à abertura ampla da cavidade abdominal até a exposição dos órgãos internos.



Foram então coletados fragmentos de pâncreas e fígado, fixados em formaldeído a 10% e processados para inclusão em parafina. Secções com 5,0  $\mu\text{m}$  de espessura foram coradas com Hematoxilina – Eosina e analisados em microscopia óptica.

#### **3.2.2.4 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância sendo que aos valores obtidos com as doses foi aplicada a análise de regressão e o teste F para comparar estado metabólico. Para a variável glicemia, os dados foram transformados para obtenção da normalidade.

Para as análises estatísticas, foi utilizado o pacote estatístico SAS (1996).

### **3.2.3 Experimento 3**

Foi realizado um experimento com doses crescentes de 0, 50, 100, 150 e 200 mg/kg de  $\beta$ -glucano extraído de plantas de *Rhynchelytrum repens*, em uma única aplicação por via intraperitoneal..

#### **3.2.3.1 Animais e delineamento experimental**

Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com peso de 189,9  $\pm$  44,9g, provenientes do Biotério do Setor de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo com quatro tratamentos mais um adicional (controle) em seis repetições.

Todos os animais foram induzidos ao diabetes experimental por meio de injeção intraperitoneal de 80 mg/kg de estreptozotocina administrada 48 horas antes do início do experimento, o qual teve duração de 24 horas.

As soluções de  $\beta$ -glucano foram preparadas nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% em água destilada. A administração dos tratamentos foi feita por via intraperitoneal, em uma única aplicação, pela manhã.

Os animais foram mantidos em ambiente controlado, com 12 horas claro/12 horas escuro a temperatura de 20° a 22°C. Tiveram acesso à água e ração comercial *ad libitum*.

### **3.2.3.2 Análises bioquímicas**

Os animais tiveram suas glicemias aferidas antes da aplicação do  $\beta$ -glucano e 6, 12, 18 e 24 horas após a aplicação. A amostra sanguínea foi coletada através da amputação na ponta da cauda para mensuração da glicemia que foi feita com glicosímetro Accu-Chek<sup>®</sup> Advantage II da marca Roche.

### **3.2.3.3 Análise estatística**

Os dados foram submetidos a análise de variância após o teste de normalidade. Os valores obtidos com as doses de  $\beta$ -glucano e os tempos de avaliação foram submetidos à análise de regressão e a média de cada comparada ao controle pelo teste de Dunnett a 5%. O programa estatístico utilizado foi o SAS (1996).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Caracterização de $\beta$ -glucanos no extrato de *Rhynchelytrum repens***

A Figura 2 mostra os dois cromatogramas que caracterizam a presença de  $\beta$ -glucanos na amostra.

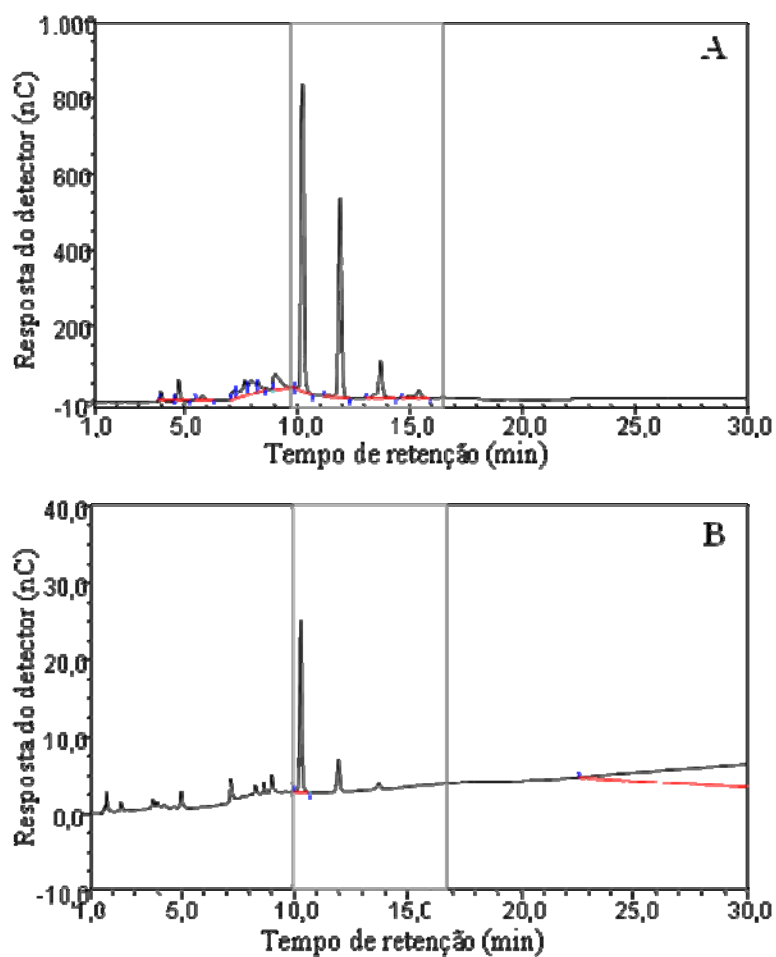


Figura 2 Cromatograma de  $\beta$ -glucano digerido com uma lichenase. A área achurada indica os picos característicos da presença de  $\beta$ -glucano, sendo o primeiro pico um trissacarídeo, o segundo um tetrassacarídeo e o terceiro um pentassacarídeo. A, padrão comercial de  $\beta$ -glucano; B, amostra da fração KOH 4M de  $\beta$ -glucano de *Rhynchelytrum repens*

Como se observa na Figura 2, o primeiro cromatograma mostra um padrão comercial de  $\beta$ -glucano digerido com uma lichenase. A mesma enzima foi adicionada à amostra. Os retângulos achurados indicam a faixa de tempo que

os fragmentos de  $\beta$ -glucano digeridos aparecem (os quatro picos do padrão). É possível visualizar picos característicos da presença de  $\beta$ -glucano na amostra mesmo que em concentrações menores se comparado com o padrão.

Os resultados observados são muito semelhantes aos resultados obtidos por De Paula et al. (2005) (Figura 3).

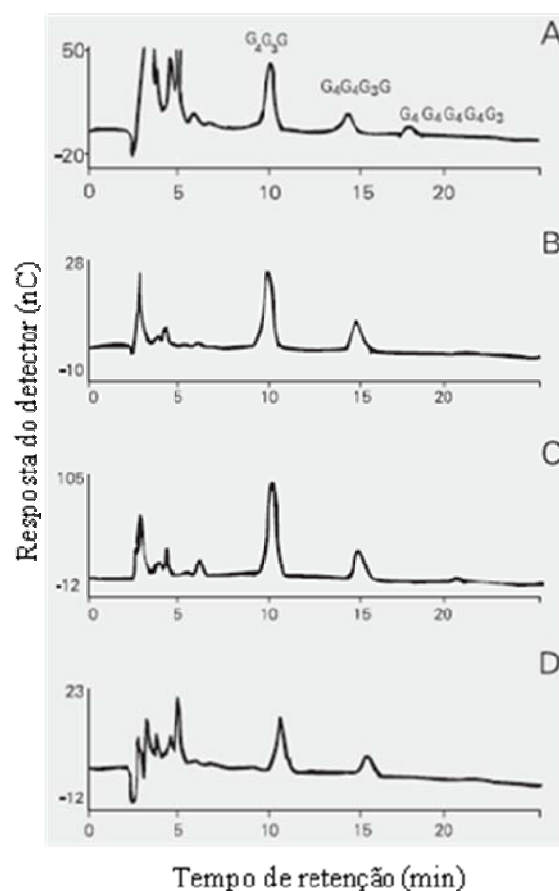


Figura 3 Cromatograma mostrando a presença de  $\beta$ -glucano em diferentes partes de *Rhynchelytrum repens*. Os picos que aparecem em cada cromatograma representam a presença de  $\beta$ -glucanos, sendo o primeiro pico trissacarídeo, o segundo tetrassacarídeo e o terceiro pentassacarídeo. (A, folhas jovens; B, lâmina foliar; C, bainha; D, caule)

Fonte Adaptado de De Paula et al. (2005)

De Paula et al. (2005) verificaram a presença de  $\beta$ -glucanos em diferentes partes do *Rhynchelytrum repens* como podemos observar na Figura 3. A presença de  $\beta$ -glucano em *Rhynchelytrum repens* foi confirmada por hidrólise com uma endoglucanase de *Bacillus subtilis* de seqüência independente. De acordo com os resultados obtidos pelos autores todos os tecidos analisados de *Rhynchelytrum repens* continham  $\beta$ -glucano em proporções parecidas com as do presente trabalho.

## **4.2 Ensaio biológicos**

Os resultados dos três experimentos realizados com ratos normais e diabéticos induzidos pela estreptozotocina, tratados ou não com  $\beta$ -glucano são apresentados a seguir.

### **4.2.1 Experimento 1**

A seguir são apresentados os resultados do experimento com dose única de 2,5 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano extraído de plantas de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias.

#### **4.2.1.1 Glicemia**

Ao se comparar a glicemia entre os dias de mensuração não houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os animais que receberam  $\beta$ -glucano e os que não receberam  $\beta$ -glucano (Tabela 1).

Tabela 1 Glicemia média (mg/dL) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose diária única de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

Estado metabólico	$\beta$ -glucano		Média <sup>1</sup>
	Não tratado	Tratado	
	1º dia		
Diabético	247,6	286,8	267,2 a
Não diabético	93,2	89,5	91,3 b
Média	170,4	188,2	
	5º dia		
Diabético	393,6	360,0	376,8 a
Não diabético	88,8	87,4	88,1 b
Média	241,2	223,7	
	9º dia		
Diabético	376,6	463,0	419,8 a
Não diabético	103,0	98,2	100,6 b
Média	239,8	280,6	
	13º dia		
Diabético	395,0	437,8	416,4 a
Não diabético	83,4	90,5	87,0 b
Média	239,2	264,2	
	17º dia		
Diabético	366,8	344,0	355,4 a
Não diabético	96,4	90,4	93,4 b
Média	231,6	217,2	
	21º dia		
Diabético	417,5	411,6	414,6 a
Não diabético	93,2	95,6	94,4 b
Média	255,3	253,6	
CV (%)	7,63		

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste F (P < 0,05)

Ao ser avaliada a glicemia do período total, pode-se observar que não houve diferença entre os animais que receberam  $\beta$ -glucano e os que não receberam. A indução do *diabetes mellitus* experimental através da dose de 80 mg/kg de estreptozotocina aplicada por via intraperitoneal foi obtida com

sucesso. Os animais induzidos apresentaram aumento ( $P < 0,05$ ) da glicemia em relação aos animais não induzidos.

De acordo com Pickup e Williams (1997), a indução do *diabetes mellitus* por uma simples injeção intravenosa ou intraperitoneal de estreptozotocina é o meio mais utilizado nos modelos experimentais. Segundo esses autores, quando aplicada em doses de 40 a 80mg/kg, os níveis de insulina diminuem levando à hiperglicemia, poliúria, polidipsia e perda de peso. Entretanto, segundo esses autores, a severa cetose que ocorre em humanos parece não acontecer nos animais, determinando assim uma sobrevivência por um período de varias semanas sem a reposição da insulina.

#### 4.2.1.2 Peso corporal

O peso médio dos animais durante o período experimental pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 Peso médio (g) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

Estado metabólico	B-glucano		Média <sup>1</sup>	Peso Inicial
	Não tratado	Tratado		
Diabético	103,0	103,6	103,3 b	89,5
Não Diabético	139,2	141,5	140,3 a	101,1
Média	121,1	122,6		
CV %	6,27			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

Os resultados mostram que os animais dos grupos induzidos ao diabetes apresentaram ganho de peso menor que os animais dos grupos não induzidos ( $P < 0,05$ ). É esperado que os indivíduos diabéticos ganhem menos



peso que indivíduos sadios. Isso ocorre, pois a falta de glicose no interior das células faz com que estas degradem lipídeos e proteínas para obter energia. Essa circunstância em médio prazo provoca a perda de peso corporal, diminuição de massa muscular e sensação de cansaço significativa (FONTES, 2002).

#### 4.2.1.3 Consumo de ração

A Tabela 3 apresenta o consumo médio diário de ração durante o experimento.

Tabela 3 Consumo médio diário de ração (g) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

Estado metabólico	B-glucano		Média <sup>1</sup>
	Não tratado	Tratado	
Diabético	27,2	25,3	26,3 a
Não diabético	22,2	22,7	22,4 b
Média	24,7	24,0	
CV %	6,87		

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os animais dos grupos diabéticos e não diabéticos, mas não se observou diferença entre os animais que receberam  $\beta$ -glucano e os que não receberam.

Os animais diabéticos tiveram maior consumo de alimento quando comparados aos animais normais devido à polifagia que é sinal clínico característico de indivíduos diabéticos, e é originada pela falta de energia que afeta os tecidos, já que estes não conseguem obter as quantidades de glicose que necessitam (PRADO; RAMOS; VALLE, 1999; SOTNIKOVA et al., 2006).

#### 4.2.1.4 Ingestão de água e volume urinário

A Tabela 4 apresenta os resultados observados para ingestão média de água e volume urinário médio.

Tabela 4 Ingestão média diária de água (mL) e volume urinário médio diário (mL) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

Estado metabólico	$\beta$ -glucano		Média <sup>1</sup>
	Não tratado	Tratado	
<i>Consumo de água</i>			
Diabético	78,0	65,7	71,8 a
Não diabético	30,0	29,5	29,7 b
Média	54,0	47,6	
CV %	13,8		
<i>Volume urinário</i>			
Diabético	35,3	36,8	36,04 a
Não diabético	0,5	1,4	1,0 b
Média	17,9	19,1	
CV %	9,14		

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

Quando avaliados a ingestão de água e o volume urinário dos animais, estes apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os animais diabéticos e os animais não diabéticos. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre animais tratados e não tratados com o  $\beta$ -glucano.

Os animais diabéticos apresentaram maior ingestão de água e volume urinário aumentado quando comparados com os animais normais. Esse resultado normalmente ocorre, conforme observado por vários autores, pois a poliúria e a polidipsia são sinais clínicos frequentes no diabetes mellitus. A poliúria é provocada pela eliminação excedente de glicose através da urina, pois os rins não conseguem reter a glicose que filtram do sangue, como ocorre nos níveis

normais de glicemia, o que proporciona eliminação de parte da glicose com a urina, arrastando consigo maior quantidade de líquido. A polidipsia, por sua vez, é originada por uma perda de líquidos provocada pelas frequentes e abundantes emissões de urina (polidipsia), que em muitos casos é praticamente constante (PRADO; RAMOS; VALLE, 1999; SOTNIKOVA et al., 2006).

## **4.2.2 Experimento 2**

Os resultados do experimento relativo a aplicação de doses crescentes de 0, 7, 14 e 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano extraído de plantas de *Rhynchelytrum repens* com duração de 21 dias, são apresentados a seguir.

### **4.2.2.1 Glicemia**

Os dados sobre a resposta da glicemia, nas diferentes doses, são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 Glicemia média (mg/dL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Dose (mg/kg/dia)	Estado metabólico		Média
	Não diabético	Diabético	
	<i>7 dias</i>		
7	91,3	304,3	197,8
14	90,3	353,5	221,9
21	92,5	336,2	214,3
Média <sup>1</sup>	92,3 a	345,1 b	
Controle	94,8	386,5	240,7
	<i>14 dias</i>		
7	86,2	380,0	233,1
14	81,5	335,8	208,7
21	82,0	341,2	211,6
Média <sup>1</sup>	83,1 a	357,2 b	
Controle	82,7	371,7	227,2
	<i>21 dias</i>		
7	79,3	387,2 <sup>2</sup>	233,3
14	78,8	354,7	216,8
21	79,4	316,8	198,1
Média <sup>1</sup>	80,2 a	354,6 b	
Controle	83,3	359,8	221,6
CV (%)	7,76		

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras nas linhas diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup> Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

Verificou-se que a glicemia nos grupos de animais normais foi menor ( $P < 0,05$ ) em comparação com os grupos de animais diabéticos e essa diferença se manteve durante todo o experimento. Aos 21 dias houve um efeito linear ( $P < 0,05$ ) das doses do  $\beta$ -glucano sobre a glicemia dos animais diabéticos, ou seja, o aumento da dose reduziu a glicemia.

Souza, De Paula e Figueiredo-Ribeiro (2004) realizaram um experimento usando o precipitado e o sobrenadante do extrato aquoso de plantas de *Rhynchelytrum repens* cultivadas em condições de irradiância reduzida e a pleno sol. O extrato (2,6 gramas de matéria seca por animal) foi aplicado por via

intraperitoneal em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e foi observado, a partir da administração do precipitado, um decréscimo de 25% e 35% da glicemia em relação aos valores iniciais e valores do grupo controle respectivamente.

#### 4.2.2.2 Peso corporal

Os pesos apresentados pelos grupos experimentais são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 Peso médio (g) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Estado metabólico	Dose do extrato (mg/kg/dia)				Média <sup>1</sup>
	0	7	14	21	
	<i>7 dias</i>				
Não diabético	189,5	184,1	182,6	172,4	182,2 a
Diabético	166,2	143,8	148,5	142,2	150,2 b
Média <sup>2</sup>	177,8	163,9	165,6	157,3	
	<i>14 dias</i>				
Não diabético	203,2	199,6	191,6	187,5	195,5 a
Diabético	156,6	162,8	155,6	144,5	154,8 b
Média <sup>2</sup>	179,9	181,2	173,6	166,0	
	<i>21 dias</i>				
Não diabético	216,6	210,5	203,7	197,2	207,0 a
Diabético	156,6	156,5	157,7	153,5	156,1 b
Média <sup>2</sup>	186,6	183,5	180,7	175,4	
CV (%)	7,61				

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste F (P < 0,05)

<sup>2</sup> Regressão linear significativa (P < 0,05)

Os resultados mostram que os animais normais ganharam mais peso (P < 0,05) ao final do experimento que os animais diabéticos. Os animais dos grupos

não induzidos apresentaram média de 30 gramas de ganho de peso ao final do experimento enquanto os animais diabéticos mostraram uma redução de 3 gramas no peso em vinte e um dias. Houve efeito linear ( $P < 0,05$ ) de redução de ganho de peso, em função da dose do  $\beta$ -glucano, tanto para os animais dos grupos normais quanto para os diabéticos.

Sendo o diabetes uma doença que representa uma complexa desordem metabólica em virtude da deficiência total ou parcial da produção e secreção de insulina (LERMEN et al., 2005; QUEIROGA et al., 2006), normalmente se observa perda de peso.

O ganho de peso reduzido ou, em casos mais agudos da doença a perda de peso, se devem a alguns fatores como: o efeito da insulina sobre a síntese e o armazenamento de lipídeos e síntese proteica, pois a insulina promove a formação de proteína e impede a sua degradação. A falta de insulina causa depleção protéica e aumento dos aminoácidos plasmáticos, então o catabolismo das proteínas aumenta, a síntese proteica cessa e grandes quantidades de aminoácidos são lançadas no plasma (GUYTON; HALL, 2006).

#### **4.2.2.3 Consumo de ração, ingestão de água e volume urinário**

O consumo médio diário de ração, ingestão média diária de água e volume urinário médio diário dos animais são apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7 Consumo médio diário de ração (g) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Estado metabólico	Dose do extrato (mg/kg/dia)				Média
	0	7	14	21	
	<i>7 dias</i>				
Não diabético	21,1 a	20,4 a	20,5 a	18,3	20,1
Diabético	28,7 b	26,2 b	24,6 b	18,8	24,6
Média <sup>2</sup>	24,9	23,3	22,6	18,6	
	<i>14 dias</i>				
Não diabético	23,3 a	22,4 a	23,3 a	19,8	22,2
Diabético	34,8 b	31,7 b	27,1 b	22,5	29,0
Média <sup>2</sup>	29,1	27,1	25,2	21,1	
	<i>21 dias</i>				
Não diabético	25,2	30,0	23,7	23,8	25,7 b
Diabético	37,3	37,9	30,3	28,6	33,5 a
Média <sup>2</sup>	31,2	34,0	27,0	26,2	
CV (%)	10,88				

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup> Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

A média de consumo de ração dos animais não induzidos durante todo o período experimental foi de 22,25 gramas/animal/dia enquanto para os animais diabéticos a média foi de 28,23 gramas/animal/dia. Houve um efeito linear ( $P < 0,05$ ) em função da dose do  $\beta$ -glucano que deprimiu o consumo de ração. Esse resultado indica que o  $\beta$ -glucano pode ter influenciado a saciedade dos animais, pois esse efeito de redução ocorreu tanto nos grupos diabéticos como nos normais.

Tabela 8 Ingestão média diária de água (mL) por animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Estado metabólico	Dose do extrato (mg/kg/dia)				Média
	0	7	14	21	
		<i>7 dias</i>			
Não diabético	28,7	30,0	27,4	25,3	27,9 b
Diabético <sup>2</sup>	81,7	69,9	76,6	44,8	68,2 a
Média	55,2	49,9	52,0	35,1	
		<i>14 dias</i>			
Não diabético	31,7	26,3	29,9	28,8	29,2 b
Diabético <sup>2</sup>	90,9	89,4	76,6	48,0	76,2 a
Média	61,3	57,8	53,2	38,4	
		<i>21 dias</i>			
Não diabético	31,7	30,1	29,4	32,0	30,8 b
Diabético <sup>2</sup>	89,0	86,9	85,4	60,7	80,5 a
Média	60,3	58,5	57,4	46,3	
CV (%)	8,78				

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup> Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

A ingestão de água durante o período experimental apresentou diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos de animais normais e os grupos de diabéticos. A ingestão de água média diária foi maior nos grupos de animais induzidos (75 ml/animal/dia) em relação aos não induzidos (29 ml/animal/dia). Houve efeito linear ( $P < 0,05$ ) na redução da ingestão de água em animais diabéticos em função das doses de  $\beta$ -glucanos.



Tabela 9 Volume urinário médio diário (mL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Estado metabólico	Dose do extrato				Média <sup>1</sup>
	0	7	14	21	
		<i>7 dias</i>			
Não diabético	1,2	2,0	1,2	0,9	1,3 b
Diabético <sup>3</sup>	46,9	39,26	36,4	38,7	40,3 a
Média	24,1	20,6	18,8	19,8	
		<i>14 dias</i>			
Não diabético	4,0	1,6	0,2	1,7	1,89 b
Diabético <sup>2</sup>	55,0	42,4	41,8	32,8	43,01 a
Média	29,5	22,0	21,0	17,3	
		<i>21 dias</i>			
Não diabético	4,6	3,1	1,6	2,1	2,8 b
Diabético <sup>2</sup>	52,7	52,7	49,8	29,0	46,1 a
Média	28,6	27,9	25,7	15,5	
CV (%)	10,30				

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup> Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

<sup>3</sup> Regressão quadrática significativa ( $P < 0,05$ )

Verificou-se que o volume urinário nos grupos de animais normais apresentou diferença ( $P < 0,05$ ) em comparação com os grupos de animais diabéticos. O volume urinário médio diário dos grupos de animais diabéticos foi de 43 ml/animal/dia, enquanto que nos animais não diabéticos o volume médio foi de 2 ml/animal/dia. Houve redução linear ( $P < 0,05$ ) do volume urinário dos animais diabéticos em função do tratamento com  $\beta$ -glucano. De Paula, Sousa, Figueiredo-Ribeiro (2006), após tratarem animais diabéticos com  $\beta$ -glucano, não comprovaram alterações no volume urinário.

Os resultados obtidos quando comparados animais normais e diabéticos para ingestão de água e volume urinário são comumente relatados, já que a poliúria e polidipsia são sintomas frequentes do *diabetes mellitus* (PRADO; RAMOS; VALLE, 1999; SOTNIKOVA et al., 2006). Porém, quando

observados somente animais diabéticos nota-se uma melhora nestes dois sintomas em função das doses de  $\beta$ -glucano.

#### 4.2.2.4 Insulina e peptídeo C

Os níveis séricos de insulina dos animais tratados com  $\beta$ -glucano são apresentados na Tabela 10. Os controles de qualidade do kit ELISA insulina para ratos ficaram entre 4,1 e 5,8 ng/mL.

Tabela 10 Níveis séricos de insulina (ng/dL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Estado metabólico	Dose do extrato (mg/kg/dia)				Média <sup>1</sup>
	0	7	14	21	
Não diabético	3,65	3,70	3,65	3,50	3,62 a
Diabético	3,07	3,07	3,21	3,03	3,09 b
Média	3,36	3,38	3,43	3,26	
CV (%)	10,39				

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F ( $P < 0,05$ )

No presente trabalho não se observou nenhuma diferença ( $P < 0,05$ ) em relação aos tratamentos administrados, porém, verificou-se que os animais normais apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) em comparação com os animais diabéticos.

O mecanismo de ação do  $\beta$ -glucano administrado por via intraperitoneal, como foi realizado neste trabalho, ainda permanece desconhecido. Estudos apontam que os  $\beta$ -glucanos aumentam a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (YOKOYAMA et al., 1997), sendo o aumento da tolerância a glicose o provável mecanismo de ação. De Paula et al. (2005) sugerem uma sinalização

dos glucanos para aumentar a secreção de insulina, o que não se confirmou no presente trabalho.

Os níveis séricos peptídeo C dos animais tratados com  $\beta$ -glucano são apresentados na Tabela 11. Os controles de qualidade do kit ELISA peptídeo C para ratos ficaram entre 4,1 e 5,8 pM.

Tabela 11 Níveis séricos de peptídeo C (pM) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

Estado metabólico	Dose do extrato (mg/kg/dia)				Média <sup>1</sup>
	0	7	14	21	
Não diabético <sup>2</sup>	4,74	4,45	4,51	4,31	4,50 a
Diabético	3,92	3,92	3,92	4,04	3,95 b
Média	4,33	4,19	4,21	4,18	
CV (%)	5,70				

<sup>1</sup> Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste F (P < 0,05)

<sup>2</sup> Regressão linear significativa (P < 0,05)

Os resultados mostram diferença (P < 0,05) dos animais diabéticos em relação aos animais não diabéticos. Houve efeito linear (P < 0,05) do  $\beta$ -glucano para os animais não diabéticos. É possível que a toxicidade da estreptozotocina tenha afetado a resposta secretora no grupo de animais diabéticos.

Diversos estudos clínicos têm avaliado a secreção pancreática em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1, em diferentes fases da doença. A maioria dos autores tem encontrado níveis detectáveis de peptídeo C ao diagnóstico em grande parte dos pacientes, especialmente naqueles diagnosticados após a puberdade (PALMER et al., 2004).

Em algumas situações, a concentração sérica de peptídeo C não é proporcional às taxas de secreção de insulina. Um exemplo disso é a disfunção renal. Cerca de 85% do peptídeo C é metabolizado pelos rins, sendo o restante

excretado intacto pela urina. Uma queda da função renal implica redução da metabolização do peptídeo C, com elevação de seus níveis séricos (COVIC et al., 2000).

#### 4.2.2.5 Análises histopatológicas

As secções histológicas do pâncreas após vinte e um dias de experimento podem ser vistas na Figura 4.

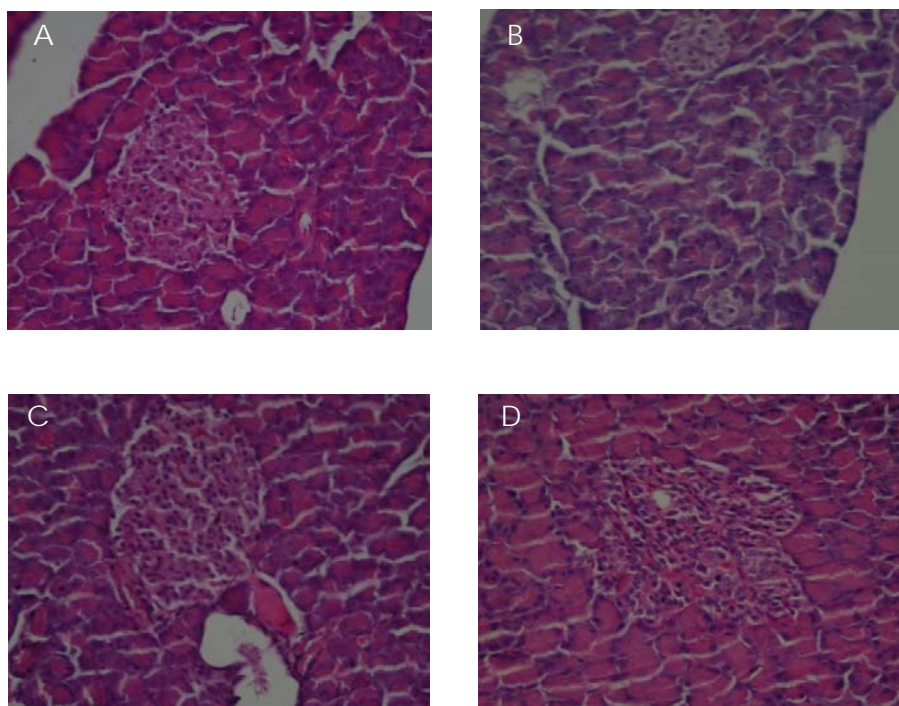


Figura 4 Aspecto histológico do pâncreas de animais normais (A), animais diabéticos (B), animais normais tratados com 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano (C) e de animais diabéticos tratados com 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano (D) (hematoxilina-eosina - 400x)

A avaliação histopatológica do pâncreas indicou uma redução da quantidade de ilhotas, assim como uma aparente diminuição em seu tamanho, nos animais diabéticos que não foram tratados com  $\beta$ -glucano como mostra a Figura 4B. Porém, pode-se observar na Figura 4D, que em animais diabéticos tratados com 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano as ilhotas se assemelham com as de animais normais (Figura 4A). De acordo com Chávez et al. (2007), a aplicação de estreptozotocina em ratos produz uma diminuição no número de ilhotas no pâncreas.

As secções histológicas do fígado após vinte e um dias de experimento podem ser vistas na Figura 5.

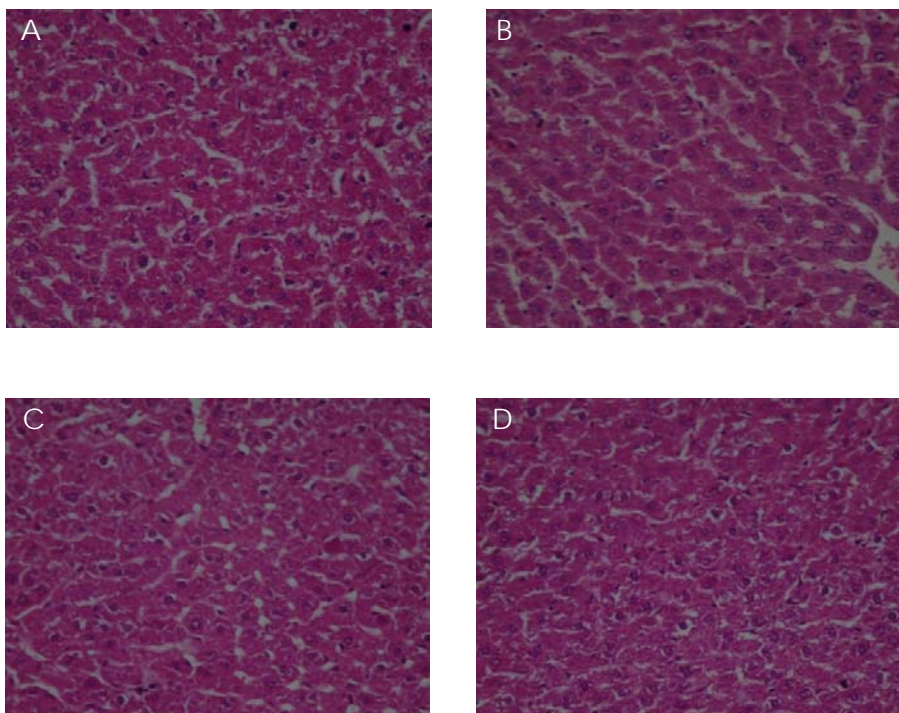


Figura 5 Aspecto histológico do fígado de animais normais (A), animais diabéticos (B), animais normais tratados com 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano (C) e de animais diabéticos tratados com 21 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano (D) (hematoxilina-eosina - 400x)

A avaliação histopatológica do fígado dos animais aparentemente não apresentou alterações microscópicas em nenhum dos grupos. Com base nos resultados obtidos neste experimento sugere-se que o  $\beta$ -glucano até a dose de 21mg/kg/dia não causa lesões hepáticas microscópicas. Segundo Schellini (1992), as características histopatológicas de fígado de ratos Wistar induzidos ao diabetes são semelhantes às características em humanos diabéticos e não apresentam alterações.

### 4.2.3 Experimento 3

A seguir são apresentados os resultados do experimento com doses de 50, 100, 150 e 200 mg/kg/dia de  $\beta$ -glucano extraído de plantas de *Rhynchelytrum repens*, com duração de 24 horas.

#### 4.2.3.1 Glicemia

Os dados sobre a glicemia, nas diferentes doses de  $\beta$ -glucano, são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 Glicemia média (mg/dL) de animais tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 24 horas

Dose (mg/kg)	Tempo (horas)				Média <sup>2</sup>	Glicemia inicial
	6	12	18	24		
50	246,7*	225,0*	206,8*	161,8*	210,1	310,3
100	345,3*	301,3*	275,5*	257,7*	295,0	389,2
150	269,8*	243,8*	225,7*	203,8*	235,8	323,7
200	244,7*	204,0*	175,5*	168,3*	198,1	329,7
Média <sup>1</sup>	276,6	243,5	220,9	197,9		
Controle	476,0	463,3	376,5	303,7	405,9	328,8
CV (%)	13,61					

\* Diferem do controle pelo teste Dunnett ( $P < 0,05$ )

<sup>1</sup> Regressão linear significativa ( $P < 0,05$ )

<sup>2</sup> Regressão quadrática significativa ( $P < 0,05$ )

Todas as doses diferiram ( $P < 0,05$ ) do grupo controle. As quatro doses administradas se mostraram eficientes na redução da glicose sanguínea. Houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) de redução da glicemia em relação as doses de  $\beta$ -glucano e um decréscimo linear ( $P < 0,05$ ) com o aumento da dose de  $\beta$ -glucano

em relação ao tempo. A partir da primeira aferição da glicemia, seis horas após a aplicação do  $\beta$ -glucano, já se observou uma queda no nível glicêmico dos animais, o qual foi decrescente até o final do experimento como apresentado na Figura 6.

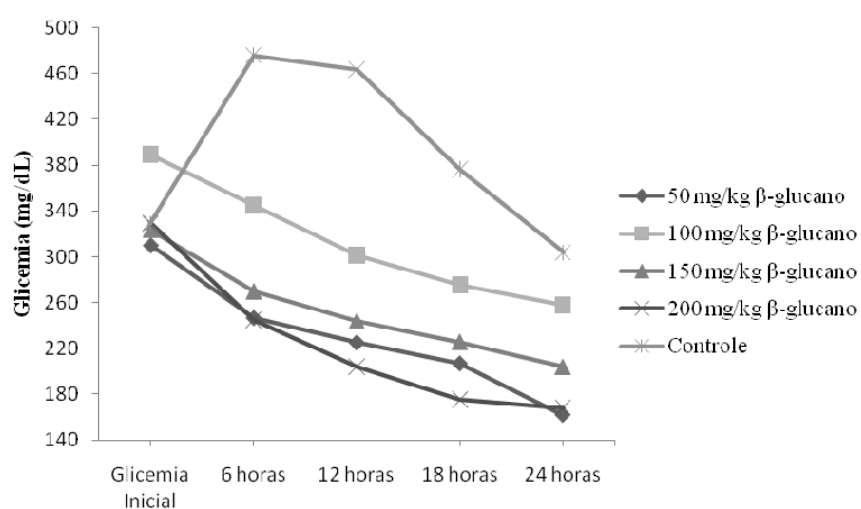


Gráfico 1 Alteração da glicemia (mg/dL) em relação a glicemia inicial de animais tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens*, em relação a glicemia inicial, durante 24 horas

De Paula et al. (2005) realizaram um experimento usando  $\beta$ -glucano purificado de plantas de *Rhynchelytrum repens* e  $\beta$ -glucano comercial extraído da cevada na dose de 100 mg/kg por via intraperitoneal em ratos induzidos ao diabetes por estreptozotocina. A glicemia foi medida antes da aplicação do  $\beta$ -glucano e 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a aplicação. O  $\beta$ -glucano da cevada diminuiu significativamente a glicemia dos animais diabéticos. Esse efeito teve uma



duração de quatro horas após a administração e voltou ao normal seis horas após a administração. O  $\beta$ -glucano do *Rhynchelytrum repens* teve um efeito similar com diminuição da glicemia mais lenta, atingindo um máximo em quatro horas, porém este efeito se manteve até as 24 horas. Esses autores sugerem que, uma possível explicação para a diferença na resposta dos animais às duas fontes de  $\beta$ -glucano pode estar relacionada com o fato de que esta substância extraída da cevada é solúvel em água e tem um nível de pureza relativamente maior. Por outro lado, o  $\beta$ -glucano de *Rhynchelytrum repens* contém uma fração de glucuronoarabinoxilano, que é menos solúvel em água, sendo possível que a liberação na corrente sanguínea tenha sido mais lenta comparada com o  $\beta$ -glucano da cevada. Essa hipótese é sustentada por dois fatos, sendo o primeiro a capacidade de interação do  $\beta$ -glucano com o glucuronoarabinoxilano, podendo estes formarem complexos intermoleculares e o segundo o fato de que recentemente foi demonstrado que o glucuronoarabinoxilano reduz a resposta glicêmica pós-prandial, administrado por via oral em humanos saudáveis (DE PAULA et al., 2005).

Os resultados de Souza, De Paula e Figueiredo-Ribeiro (2004) sugerem que as hemiceluloses do capim favorito estejam relacionadas ao uso popular desta planta no tratamento do diabetes, uma vez que a decocção é suficiente para solubilizar os  $\beta$ -glucanos presentes em várias partes da planta e também que a infusão do *Rhynchelytrum repens* possui efeito hipoglicemiante quando administrada por via intraperitoneal em ratos diabéticos.

O precipitado do extrato aquoso obtido pelo cozimento (decocção) teve um efeito hipoglicêmico quando administrado por via intraperitoneal em ratos induzidos por estreptozotocina. Esses resultados, em conjunto com a demonstração hipoglicemiante do  $\beta$ -glucano da cevada e do  $\beta$ -glucano de *Rhynchelytrum repens*, obtido no experimento sugerem que o polímero da parede celular pode ser absorvido quando administrado por via intraperitoneal e

pode estar envolvido nos efeitos hipoglicemiantes observados (DE PAULA et al., 2005).

O presente trabalho reforça os resultados dos trabalhos anteriores e a hipótese da absorção do  $\beta$ -glucano quando administrado por via intraperitoneal e de sua ação hipoglicemiante. Todas as doses acima de 50 mg/kg de  $\beta$ -glucano de *Rhynchelytrum repens* tiveram efeito na redução da glicemia de animais diabéticos, sendo que a dose de 200 mg/kg de  $\beta$ -glucano apresentou maior redução da glicemia ao final das 24 horas do experimento, alcançando um decréscimo de 48,5% em relação à glicemia inicial.

Outros autores relatam que um efeito hipoglicemiante transitório das frações contendo polímeros de alto peso molecular foi demonstrado em extratos de várias espécies. Takahashi, Konno e Hikino (1985) observaram a atividade hipoglicemiante da porção não dializada do suco da cana-de-açúcar, que contém em sua parede celular frações de hemicelulose compostas de  $\beta$ -glucano e glucuronoarabinoxilano. Esses pesquisadores relataram que os principais constituintes do suco da cana mostraram um efeito transitório da diminuição da glicemia sanguínea sete horas após a administração, mas nenhum efeito após 24 horas.

## 5 CONCLUSÃO

A fração rica em  $\beta$ -glucanos obtida de *Rhynchelytrum repens* reduz a glicemia de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. A melhor dosagem de uso para 21 dias é de 21 mg/kg/dia e, para efeito imediato até 24 horas de 50 mg/kg.

## REFERÊNCIAS

AGÜERO, L. L. et al. Utilización de extractos de *Avena sativa* L. en dermatitis. **Revista Argentina de Dermatología**, Buenos Aires, v. 87, n. 2, p. 100-105, mayo 2006.

ANGELI, J. P. F. et al. Protective effects of  $\beta$ -glucan extracted from barley against benzo[a]pyrene-induced DNA damage in hepatic cell HepG2. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Munique, v. 61, n. 1, p. 83-89, Jan. 2009.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Plants and their active constituents from south Central and North America with hypoglycemic activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 392-413, Oct./Dec. 2005.

CARDOSO, L. M. et al. Aspectos importantes na prescrição do exercício físico para o *diabetes mellitus* tipo 2. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, São Paulo, v. 1, n. 6, p. 59-69, nov./dez. 2007.

CARPITA, N. C. Cell wall development in maize coleoptiles. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 76, n. 1, p. 205-212, Sept. 1984.

CARPITA, N. C.; KANABUS, J. Chemical structure of the cell walls of dwarf maize and changes mediated by gibberelin. **Plant Physiology**, Paulo Alto, v. 88, n. 3, p. 671-678, Nov. 1988.

CARPITA, N. C. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 445-476, June 1996.

CARPITA, N. V.; GIBEAUT D. M. Tracing the biosynthesis of the cell wall in intact cell and plants: selective turnover and alteration of cytoplasmic and cell wall polysaccharides of proso millet cells in liquid culture and *Zea mays* seedlings. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 97, n. 2, p. 551-561, Oct. 1991.

CAVALLERO, A. et al. High (1 $\rightarrow$ 3,1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucan barley fractions in bread making and their effects on human glycemic response. **Journal of Cereal Science**, London, v. 36, n. 1, p. 59-66, July 2002.

CHÁVEZ, A. A. et al. Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicémica de la glibenclamida. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, Benito Juárez, v. 38, n. 3, p. 5-11, jul./sept. 2007.

COLLINS, T.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 38.

COVIC, A. M. et al. Serum C-peptide concentrations poorly phenotype type 2 diabetic end-stage renal disease patients. **Kidney International**, Malden, v. 58, n. 4, p. 1742-1750, Oct. 2000.

DE FRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North América**, Philadelphia, v. 88, n. 4, p. 787-835, July 2004.

DE FRONZO, R. A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Annals of International Medicine**, Philadelphia, v. 131, n. 4, p. 281-303, Aug. 1999.

DE PAULA, A. C. C. F. F. **Carboidratos flavonóides e atividade antidiabética de *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C. E. Hubb Capim-favorito (Poaceae)**. 2002. 170 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

DE PAULA, A. C. C. F. F. et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing  $\beta$ -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. Poaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 6, p. 885-893, June 2005.

DE PAULA, A. C. C. F. F.; SOUSA, R. V.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Assessment of anti-hyperglycemic activity of the tropical grass extracts, *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. in streptozotocin-induced diabetic rats. In: CONGRESSO PAULISTA DE DIABETES E METABOLISMO, 7., 2006, Guarujá. **Anais...** Guarujá. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, 2006. v. 50, p. 191-192.

EHRENBERGEROVÁ, J. et al. Changes caused by genotype and environmental conditions in beta-glucan content of spring barley for dietetically beneficial human nutrition. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 63, n. 3, p. 111-117, Sept. 2008.

EL-BACHA, T. Insulina. In: Da POIAN, A.T.; CARVALHO-ALVES, P. C. **Hormônios e metabolismo: integração e correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002. cap. 2, p. 27-57.

FILGUEIRAS, T. S. A floristic analysis of the gramineae of Brasil Distrito Federal and a list of the species occurring in the area. **Edinburgh Journal of Botany**, Edinburgh, v. 48, n. 1, p. 73-80, Jan. 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. Cell walls and their components in cereal grain technology. In: POMERANZ, Y. (Ed.). **Advances in cereal science and technology**. Minnessota: American Association of Cereal Chemists, 1986. chap. 8, p. 207-295.

FONTES, C. F. L. Diabetes. In: DA POIAN, A. T.; CARVALHO-ALVES, P. C. **Hormônios e metabolismo: integração e correlações clínicas**. São Paulo: Atheneu, 2002. cap. 9, p. 215-262.

FUJITA, A. H.; FIGUEROA, M. O. R. Composição centesimal e teor de  $\beta$ -glucanas em cereais e derivados. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 116-120, maio/ago. 2003.

GIBEAUT, D. M.; CARPITA, N. C. Synthesis of (1 leads to 3), (1 leads to 4)-beta-D-glucan in the Golgi apparatus of maize coleoptiles. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 90, n. 9, p. 3850-3854, May 1993.

GRUNBERGER, G. et al. Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide. **Diabetologia**, New York, v. 44, n. 10, p. 1247-1257, Oct. 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 883-894.

HARDMAN, J. G.; MOLINOFF, P. B.; GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. cap. 60, p. 1103.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Task force on diabetes health economics, facts, figures and forecast Brussels: international diabetes federation**. Disponível em: <<http://www.idf.org/sustainable-diabetes-and-ncd-policy-and-prevention>>. Acesso em: 4 jul. 2010.

INZUCCHI, S. E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 287, n. 3, p. 360-372, Jan. 2002.

KIM, J. B.; OLEK, A. T.; CARPITA, N. C. Plasma membrane and cell wall exo- $\beta$ -D-glucanases in developing maize coleoptiles. **Plant Physiology**, Palo Alto, v. 123, n. 2, p. 471-485, June 2000.

LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Molecular aspects of cereal  $\beta$ -glucan functionality: physical properties technological applications and physiological effects. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 2, p. 101-118, Sept. 2007.

LERMEN, D. T. et al. Avaliação dos componentes da síndrome plurimetabólica visando prevenção das doenças cardiovasculares. **Cogitare Enfermagem**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 48-52, abr. 2005.

LI, Z. G.; ZHANG, W.; SIMA, A. A. F. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose induced apoptosis in SH-SY5Y cells. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, Chichester, v. 19, n. 5, p. 375-385, Sept./Oct. 2003

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres aquáticas parasitas e tóxicas. São Paulo: Nova Odessa, 2000. 440 p.

LOHR, M.; KLÖPPEL, G. Residual insulin positivity and pancreatic atrophy in relation to duration of chronic type 1 (insulin-dependent) *diabetes mellitus* and microangiopathy. **Diabetologia**, New York, v. 30, n. 10, p. 757-762, Oct. 1987.

MAASSEN, J. A.; OUWENS, D. M. Mechanism of insulin action. **Molecular Pathogenesis of Diabetes Mellitus**, v. 22, p. 201-221, 1997.

MALERBI, D. et al. Posição de consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes: insulino terapia intensiva e terapêutica com bombas de insulina. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabolismo**, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 125-135, fev. 2006.

MÄLKKI, Y. Physical properties of dietary fiber as keys to physiological functions. **Cereal Foods World**, Minneapolis, v. 46, n. 5, p. 196-199, May 2001.

MÄLKKI, Y.; VIRTANEN, E. Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie Food Science and Technology**, London, v. 34, n. 6, p. 337-347, Sept. 2001.

MARCONI, E.; GRAZIANO, M.; CUBADDA, R. Composition and utilization of barley pearling by-products for making functional pastas rich in dietary fiber and  $\beta$ -glucans. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 77, n. 2, p. 133-139, Mar./Apr. 2000.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents: review. **Phytomedicine**, Jena, v. 2, n. 3, p. 137-189, Aug. 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of Biochemistry**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000. 725 p.

NILSSON, A. et al. Effects of GI and content of indigestible carbohydrates of cereal-based evening meals on glucose tolerance at a subsequent standardized breakfast. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 60, n. 9, p. 1092-1099, Sept. 2006.

PALMER, J. P. et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 october 2001. **Diabetes**, Seattle, v. 53, n. 1, p. 250-264, Jan. 2004.

PEPATO, M. T. et al. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 49-57, July 1993.

PICK, M. E. et al. Barley bread products improve glycemic control of type 2 subjects. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Londres, v. 49, n. 1, p. 71-78, Jan. 1998.

PICKUP, J. C.; WILLIAMS, G. **Textbook of diabetes**. 2. ed. London: Blackwell Science, 1997. 1520 p.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. A evolução da insulinoterapia no diabetes melito tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolismo**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 268-278, mar. 2008.

PRADO, F. C. do; RAMOS, J. A.; VALLE, J. R. do. **Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento**. 19. ed. São Paulo: Artes médicas, 1999. p. 563-575.



QUEIROGA, M. R. et al. Efeitos do exercício físico agudo sobre a glicemia e lipidemia de ratos diabéticos tratados com metformina. **Revista da Educação Física/UEM**, Maringá, v. 17, n. 2, p. 169-175, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 323-324.

RODACKI, M.; MILECH, A.; OLIVEIRA, J. E. P. A secreção residual do peptídeo C faz diferença no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 1? **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabolismo**, São Paulo, v. 52, n. 2, p. 322-333, mar. 2008.

ROGLIC, G. et al. The burden of mortality attributable to diabetes. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 28, n. 9, p. 2130-2135, Sept. 2005.

SALGADO, S. M. et al. Aspectos físico-químicos e fisiológicos do amido resistente. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimento**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 109-122, jan. 2005.

SCHELLINI, S. A. **Retinopatia diabética experimental**: estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados. 1992. 159 p. Tese (Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1992.

SILVA, A. M.; AIDAR, M. P. M.; BUCKERIDGE, M. S. Caracterização parcial dos  $\beta$ -glucanos ao longo do desenvolvimento foliar em *Brachiaria decumbens* Stapf. **Hoehnea**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 99-105, mar. 2006.

SKENDI, A.; PAPAGEORGIOU, M.; BILIADERIS, C. G. Effect of barley  $\beta$ -glucan molecular size and level on wheat dough rheological properties. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 91, n. 4, p. 594-601, Feb. 2009.

SOTNIKOVA, R. et al. Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes. **General Physiology and Biophysics**, Bratislava, v. 25, n. 3, p. 289-302, 2006.

SOUZA, A.; DE PAULA, A. C. C. F. F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Effects of irradiance on non-structural carbohydrates growth and hypoglycemic activity of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. (Poaceae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 64, n. 3b, p. 697-706, Aug. 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **Sas User's Guide**: statistics version 6. 4. ed. Cary, NC, 1996. v. 2, 400 p.

STAUDTE, R. G. et al. Water-soluble (1→3),(1→4)-β-D-glucans from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm: III. distribution of cellotriosyl and cellotetraosyl residues. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 3, n. 4, p. 299-312, 1985.

TAKAHASHI, M.; KONNO, C.; HIKINO, H. Isolations and hypoglycaemic activity of saccharans A., B, C, D, E and F, glycans of *Saccharum officinarum* Stalks. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 51, p. 258-260, June 1985.

TAVERNARI, F. C. et al. Polissacarídeo não-amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 5, n. 5, p. 673-689, 2008.

WHITE, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. **Diabetologia**, New York, v. 40, n. 1, p. 2-7, Jan. 1997.

YOKOYAMA, W. H. et al. Effect of barley β-glucan in durum wheat pasta on human glycemic response. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 74, n. 3, p. 293-294, May/June 1997.

## ANEXOS

## ANEXO A – Tabelas

TABELA 1A	Análise de variância da glicemia média (mg/dL) de animais tratados com $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> na dose diária única de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias.....	68
TABELA 2A	Análise de variância do peso médio (g) de animais tratados com $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias .....	68
TABELA 3A	Análise de variância do consumo médio diário de ração (g) de animais tratados com $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias .....	68
TABELA 4A	Análise de variância da ingestão média diária de água (mL) de animais tratados com $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias .....	69
TABELA 5A	Análise de variância do volume urinário médio diário (mL) de animais tratados com $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias .....	69
TABELA 6A	Análise de variância da glicemia média (mg/dL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> durante 21 dias.....	69
TABELA 7A	Análise de variância do peso médio (g) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> durante 21 dias.....	70
TABELA 8A	Análise de variância do consumo médio diário de ração (g) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de $\beta$ -glucanos de <i>Rhynchelytrum repens</i> durante 21 dias.	70

- TABELA 9A Análise de variância da ingestão média diária de água (mL) por animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias. 71
- TABELA 10A Análise de variância do volume urinário médio diário (mL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias. 71
- TABELA 11A Análise de variância dos níveis séricos de insulina (ng/dL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias. 72
- TABELA 12A Análise de variância dos níveis séricos de peptídeo C (pM) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias ..... 72
- TABELA 13A Análise de variância da glicemia média (mg/dL) de animais tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 24 horas ..... 73

TABELA 1A Análise de variância da glicemia média (mg/dL) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose diária única de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	3336,623	3336,623	1143,818	0,000
Extr	1	1,700	1,700	0,583	0,457
EM*Extr	1	2,626	2,626	0,900	0,358
Erro 1	15	43,756	2,917		
Tempo	5	85,495	17,099	14,118	0,000
Tempo*EM	5	85,495	17,099	14,118	0,000
Tempo*Extr	5	10,188	2,038	1,682	0,145
Tempo*EM*Extr	5	10,188	2,038	1,682	0,145
Erro 2	105	127,170	1,211		

TABELA 2A Análise de variância do peso médio (g) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	15,247	15,247	31,710	0,000
Tratamento	1	0,016	0,016	0,030	0,857
EM*Tratamento	1	0,007	0,007	0,010	0,908
Erro	18	8,656	0,481		

TABELA 3A Análise de variância do consumo médio diário de ração (g) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	0,795	0,795	7,040	0,016
Tratamento	1	0,023	0,023	0,210	0,655
EM*Tratamento	1	0,067	0,067	0,590	0,451
Erro	18	2,035	0,113		

TABELA 4A Análise de variância da ingestão média diária de água (mL) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	44,507	44,507	51,730	0,000
Tratamento	1	0,845	0,845	0,980	0,335
EM*Tratamento	1	0,837	0,837	0,970	0,337
Erro	18	15,488	0,860		

TABELA 5A Análise de variância do volume urinário médio diário (mL) de animais tratados com  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* na dose de 2,5mg/kg/dia durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	140,950	140,950	1613,940	0,000
Tratamento	1	0,579	0,579	6,630	0,019
EM*Tratamento	1	0,174	0,174	1,990	0,175
Erro	18	1,572	0,087		

TABELA 6A Análise de variância da glicemia média (mg/dL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	3172,524	3172,524	2723,770	0,000
Dose	3	9,497	3,166	2,720	0,050
EM*Dose	3	6,053	2,018	1,730	0,167
Glicemia inicial	1	116,577	116,577	100,090	0,000
Peso inicial	1	4,522	4,522	3,880	0,052
Erro 1	38	205,246	5,401		
Tempo	2	0,786	0,393	0,340	0,715
EM*Tempo	2	6,338	3,169	2,720	0,072
Dose*Tempo	6	11,027	1,838	1,580	0,164
EM*Dose*Tempo	6	9,185	1,531	1,310	0,260
Erro	80	93,180	1,165		

TABELA 7A Análise de variância do peso médio (g) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	61100,424	61100,424	347,050	0,000
Dose	3	4360,872	1453,624	8,260	0,000
EM*Dose	3	197,752	65,917	0,370	0,772
Peso inicial	1	75286,435	75286,435	427,630	0,000
Glicemia inicial	1	6241,854	6241,854	35,450	0,000
EM*Dose*Rep	38	25187,904	662,840	3,760	0,000
Tempo	2	5729,625	2864,813	16,270	0,000
EM*Tempo	2	2161,478	1080,739	6,140	0,003
Dose*Tempo	6	844,150	140,692	0,800	0,573
EM*Dose*Tempo	6	992,544	165,424	0,940	0,472
Erro	80	14084,382	176,055		

TABELA 8A Análise de variância do consumo médio diário de ração (g) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	1469,317	1469,317	185,850	0,000
Dose	3	989,129	329,710	41,700	0,000
EM*Dose	3	309,267	103,089	13,040	0,000
Peso inicial	1	7,501	7,501	0,950	0,333
Glicemia inicial	1	11,154	11,154	1,410	0,238
EM*Dose*Rep	38	368,494	9,697	1,230	0,220
Tempo	2	1270,507	635,253	80,350	0,000
EM*Tempo	2	71,272	35,636	4,510	0,014
EM*Dose*Tempo	6	25,227	4,204	0,530	0,783
Erro	80	632,482	7,906		

TABELA 9A Análise de variância da ingestão média diária de água (mL) por animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	361,960	361,960	961,750	0,000
Dose	3	32,064	10,688	28,400	0,000
EM*Dose	3	26,393	8,798	23,380	0,000
Glicemia inicial	1	0,623	0,623	1,650	0,202
Peso inicial	1	0,001	0,001	0,000	0,962
EM*Dose*Rep	38	16,545	0,435	1,160	0,288
Tempo	2	6,175	3,087	8,200	0,001
EM*Tempo	2	1,327	0,664	1,760	0,178
Dose*Tempo	6	1,480	0,247	0,660	0,686
EM*Dose*Tempo	6	3,014	0,502	1,330	0,252
Erro	80	30,109			

TABELA 10A Análise de variância do volume urinário médio diário (mL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Estado metabólico	1	973,664	973,664	5972,300	0,000
Dose	3	18,946	6,315	38,740	0,000
EM*Dose	3	6,122	2,041	12,520	0,000
Glicemia inicial	1	0,004	0,004	0,030	0,869
Peso inicial	1	0,941	0,941	5,770	0,019
EM*Dose*Rep	38	10,011	0,263	1,620	0,037
Tempo	2	4,876	2,438	14,960	0,000
EM*Tempo	2	0,141	0,070	0,430	0,651
Dose*Tempo	6	5,673	0,946	5,800	0,000
EM*Dose*Tempo	6	5,547	0,925	5,670	0,000
Erro	80	13,042			



TABELA 11A Análise de variância dos níveis séricos de insulina (ng/dL) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
EM	1	3,374	3,374	27.71	0.0001
Dose	3	0,177	0,059	0.48	0.6959
EM*Dose	3	0,077	0,026	0.21	0.8885
Glicemia	1	0,017	0,017	0.14	0.7068
Peso inicial	1	0,003	0,003	0.02	0.8795
Erro	38	4,627	0,123		

TABELA 12A Análise de variância dos níveis séricos de peptídeo C (pM) de animais diabéticos e não diabéticos tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 21 dias

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
EM	1	3,654	3,654	62,850	0,000
Dose	3	0,181	0,060	1,040	0,386
EM*Dose	3	0,469	0,156	2,690	0,060
EM d D1	1	2,041	2,041	35,100	0,000
EM d D2	1	0,833	0,833	14,320	0,001
EM d D3	1	1,033	1,033	17,770	0,000
EM d D4	1	0,217	0,217	3,730	0,061
Dose d EM1	3	0,581	0,194	3,330	0,030
Linear	1	0,458	0,458	7,870	0,008
Quadrático	1	0,016	0,016	0,270	0,605
Desvio	1	0,107	0,107		
Dose d EM2	3	0,070	0,023	0,400	0,753
Glicemia	1	0,143	0,143	2,460	0,125
Peso inicial	1	0,047	0,047	0,810	0,374
Erro	38	2,210	0,058		

TABELA 13A Análise de variância da glicemia média (mg/dL) de animais tratados com diferentes doses de  $\beta$ -glucanos de *Rhynchelytrum repens* durante 24 horas

FV	GL	SQ	QM	F	P
Dose	3	133823,115	44607,705	6,736	0,003
Glicemia inicial	1	19380,392	19380,392	2,927	0,104
Peso inicial	1	301290,166	301290,166	45,499	0,000
Erro a	18	119194,067	6621,893		
Tempo	3	81120,448	27040,149	17,797	0,000
D*T	9	4046,427	449,603	0,296	0,974
Adicional	1	838368,852	838368,852	551,791	0,000
Erro b	74	112432,667	1519,360		