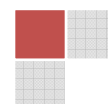


**DETERMINAÇÃO DA AÇÃO HIPOGLICEMIANTE DA *Azadirachta indica*, A.
JUSS (NEEM) ACLIMATADA NO BRASIL**

Marília Ferreira ROSA¹, Maria Rita PACHECO¹, Annita Morais GIRARDI², Matheus
Henrique Magalhães SILVA¹, Edanir dos SANTOS², Silvana Martinez Baraldi
ARTONI¹

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.



RESUMO

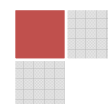
Avaliou-se a ação hipoglicemiante dos extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica*, A. Juss e da estreptozotocina em ultra alta diluições sobre ratos com diabetes mellitus induzida por injeção de estreptozotocina. O uso desta planta medicinal no controle do diabetes mellitus é duvidoso, considerando-se que a glicemia dos animais tratados com seus extratos, no 30º dia, foi maior do que a do grupo controle branco diabético. Os animais do grupo tratado com estreptozotocina 6CH mostraram, no 30º dia, os menores níveis glicêmicos. A curva glicêmica do grupo controle branco revelou-se, praticamente, constante durante o período experimental.

Palavras-chave: glicemia, pâncreas, *Azadirachta indica*, estreptozotocina, ratos.

ABSTRACT

Was evaluated the hypoglycemic action of aqueous and hydroalcoholic leaf extract of *Azadirachta indica*, A. Juss and streptozotocin in ultra high dilutions of rats with diabetes induced by streptozotocin injection. The use of this medicinal plant in the control of diabetes mellitus is doubtful, considering that glycemia in animals treated with their extracts, on the 30th day, was higher than that of diabetic control group. The animals in the group treated with streptozotocin 6CH showed, on the 30th day, the lowest glucose levels. The glycemic curve of the non-diabetic control group was practically constant during the experimental period.

Key Words: glycemia, pancreas, *Azadirachta indica*, streptozotocin, rats.

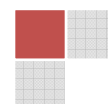


INTRODUÇÃO

Uma gama enorme de espécies vegetais foi incorporada à medicina tradicional devido ao uso experimental das espécies, compilando os resultados, positivos ou negativos, para poder observar se aquela planta teria uma ação farmacológica ou não (Di STASI, 1996). Assim, julga-se que a importância deste estudo respalda-se na grande utilização de plantas medicinais, prática tradicional ainda existente por todo o mundo, tendo inclusive recebido incentivos da própria O.M.S. São muitos os fatores que vêm colaborando no desenvolvimento de práticas de saúde que envolvam plantas medicinais, principalmente os econômicos e sociais (MARTINS et al., 1994).

A *Azadirachta indica* A. Juss, também conhecida como Nim (Neem), Nim Indiano, Margosa, *Antelara azadirachta* ou *Melia azadirachta*, planta da família *Meliaceae*, é originária das regiões áridas da Índia (CHOPRA, 1958; SAXENA, 1993), muito resistente e de crescimento rápido, alcança de 10 a 15 metros de altura, podendo chegar até 25 metros (SCHMUTTERER, 1990). A planta prefere climas tropicais, é resistente a longos períodos secos e tolerante as altas temperaturas. Não tolera geadas e, caso ocorram temperaturas abaixo de 8°C, seu crescimento é interrompido (KOCH, 1990). Não é exigente em solos, porém não tolera locais encharcados e salinos (SCHMUTTERER, 1990). O Nim foi introduzido no país em 1993, na EMBRAPA-CNPAP (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão) em Goiânia, GO, com o intuito de preparação de um carrapaticida para o rebanho bovino. Atualmente, sabe-se que possui uma grande concentração de terpenóides em suas cascas, folhas e sementes (RAGASA et al., 1997) e estes compostos são, em sua maioria, os responsáveis pelas suas ações terapêuticas.

A ação hipoglicemiante das plantas medicinais *Azadirachta indica*, *Gymnema silvestre*, *Catharanthus roseus* e *Ocinum sanctum* foram testadas em ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina. Destas plantas o extrato das folhas da *Azadirachta indica* foi o mais potente delas (CHATTOPAHYAY, 1999; ALAM et al., 1990). Por outro lado, Khosla et al., (2000) confirmaram a ação hipoglicemiante da *Azadirachta indica* quando ele tratou coelhos diabéticos aloxânicos com extratos de folhas e óleo das sementes. O efeito hipoglicemiante foi comparado à glibenclamida

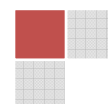


sugerindo que a *Azadirachta indica* seria benéfica no controle dos níveis glicêmicos do diabetes mellitus.

Com relação à interação do ambiente e a concentração de princípios ativos em plantas medicinais, traz-se estes conhecimentos para a planta em estudo, a *Azadirachta indica* A. Juss. Pois, apesar de todas as suas atividades terapêuticas terem sido comprovadas com trabalhos científicos, não existe nenhum trabalho relatando sua atividade hipoglicemiante realizado no Brasil, com exemplares cultivados no país.

Em anos recentes, frente à importância assumida pelo Diabetes mellitus na saúde humana e animal, estudos cada vez mais aprofundados sobre o pâncreas endócrino têm sido realizados. O Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por níveis elevados de glicemia, devido à deficiência e/ou resistência à insulina. No que se refere ao desenvolvimento da doença, a morbidade associada ao diabetes de longa duração (tipos 1 e 2, respectivamente, diabetes mellitus insulino-dependente - DMID e diabetes mellitus não-insulino-dependente - DMNID) decorre de várias complicações graves, como distúrbios macrovasculares, microangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatia (RANG et al., 2000). A maior parte das evidências experimentais e clínicas disponíveis sugere que as complicações representam uma consequência dos distúrbios metabólicos, principalmente da hiperglicemia. Em virtude disso, estudos envolvendo substâncias com ação hipoglicemiante tornam-se imprescindíveis na tentativa de proporcionar maior conforto ao doente diabético, levando-se em consideração que esse fator é dependente do bom funcionamento das células beta pancreáticas.

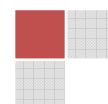
No que diz respeito à indução do diabetes mellitus, Furlan (2001), após revisão de literatura sobre a estreptozotocina (STZ), como agente diabetogênico, relatou que apesar do grande número de alterações que aparecem após o tratamento com STZ em sistemas, in vivo e in vitro, muitas delas são certamente decorrentes da lesão tóxica da STZ sobre as células β , mas não estão primariamente envolvidas no mecanismo da sua toxicidade. Da mesma forma, é possível que a lesão da célula β envolva conjuntos de fatores cuja importância individual pode depender da dose da droga, das condições de exposição à STZ e também da susceptibilidade do organismo, determinada por variáveis como espécie e idade. Recuperações espontâneas do quadro diabético foram raramente observadas em ratos, com doses de 35mg/kg de peso corporal. Entretanto, descreveu reversão do quadro diabético em ratos com doses de STZ entre 30 e 40mg/kg de peso,



com retorno à condição de normoglicemia em 10 dias e da secreção de insulina em resposta à glicose em três meses. Mencionou, ainda, que o acúmulo de STZ ocorre nas porções centrais das ilhotas pancreáticas, correspondendo à posição ocupada pelas células β , e que esta droga é um agente diabetogênico em ratos, e a sua especificidade sobre as células β parece ser acentuada, ao ocasionar picnose nuclear sem desgranulação celular, uma hora após a administração da droga, e necrose extensa com desgranulação das células β sete horas após a injeção de STZ em ratos em jejum, enquanto que as células endócrinas e o tecido acinar circundante mantiveram uma aparência normal. As melhores evidências de necrose foram obtidas 24 horas após a administração da droga. Mais recentemente um estudo mostrou que a morte das células β segue padrões diferentes em função da dose da droga. Taxas maiores de apoptose foram observadas quando as células foram expostas a doses mais baixas; e doses maiores aumentaram a proporção de células perdidas por necrose. Narrou, também, que a injeção de STZ produz flutuações trifásicas do nível de glicose sangüínea. Em ratos, a hiperglicemia inicial atinge o máximo cerca de 2 horas após a injeção da droga e é seguida por hipoglicemia acentuada com níveis glicêmicos mínimos cerca de 10 horas após a injeção. A terceira fase é representada pela hiperglicemia permanente. Algumas explicações foram propostas para justificar o padrão glicêmico trifásico. Inicialmente, a depleção de glicogênio hepático é relativamente concomitante com o aumento da glicose sangüínea. Outros efeitos do diabetes por STZ incluem aumento progressivo da glicosúria e do volume urinário na primeira semana após a indução. O peso corporal dos animais tende a diminuir ou se estabiliza, enquanto animais controle da mesma idade e peso inicial apresentam aumento ponderal progressivo. A lipemia está presente no diabetes por STZ, mas a cetonúria é rara, sendo observada em ratos apenas com doses de 100mg/kg de peso corporal.

Negri *apud* Marles e Farnsworth (2005), após revisão, sugeriu que a estreptozotocina estimula a produção de radicais livres, o que leva a destruição e disjunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Este xenobiótico tem sido usado para induzir o diabetes com concomitante deficiência de insulina. Uma dose simples em ratos pode produzir um modelo experimental do diabetes tipo II.

Parshad et al. (1999) encontraram em suas pesquisas sobre os efeitos do extrato aquoso do Neem (*Azadirachta indica*, A. Juss), em ratos diabéticos induzidos pela



estreptozotocina, melhora significativa nos pesos dos animais e diminuição da mortalidade, porém, não ocorreu normalização dos níveis de glicose sanguínea.

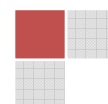
Khosla et al. (2000) observaram efeitos hipoglicemiantes do extrato das folhas e do óleo das sementes de *Azadirachta indica* (L.) em coelhos diabéticos induzidos pela aloxana como tratamento preventivo, 2 semanas antes da indução, e em outro grupo tratado por 4 semanas após a indução. O tratamento preventivo inibiu parcialmente o aumento do nível de glicose sanguínea quando comparado aos animais do grupo controle diabético, porém o efeito mais significativo foi observado no grupo tratado durante 4 semanas. Sugeriu que a *Azadirachta indica* (L.) pode ser benéfica para o diabetes mellitus controlando o açúcar sanguíneo ou podendo também ajudar na prevenção do aparecimento da doença.

Hussain (2002) ao estudar a reversão da retinopatia utilizando *Azadirachta indica* (L.) em diabetes mellitus induzida por estreptozotocina demonstrou que o tratamento aquoso do Neem, revelou um efeito favorável sobre a glicemia e tolerância à glicose, como também reduziu os lipídios séricos e peso corporal. Outros aspectos importantes foram as reversões completas das mudanças anormais da retina e das inflamações das patas dos animais.

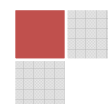
Negri *apud* Chattopadhyay (2005), após revisão sobre plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes, entendeu que o extrato das folhas de *Azadirachta indica*, A. Juss bloqueia significativamente o efeito inibitório da serotonina sobre a liberação de insulina mediada pela glicose e que o efeito hipoglicemiante do extrato pode ser devido à liberação de insulina.

Em relação ao tratamento homeopático do diabetes mellitus, Santos (1990) verificou ação hipoglicemiante da aloxana em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (aloxana 6CH) em ratos diabéticos.

O pâncreas está revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso que envia septos para o seu interior, separando-o em lóbulos (BANKS, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). É uma glândula mista exócrina e endócrina, que produz enzimas digestivas e hormônios. As enzimas são armazenadas e secretadas por células da porção exócrina, arranjadas em ácinos. Os hormônios são sintetizados em grupamentos de células epiteliais endócrinas conhecidos como ilhotas de Langerhans. Núcleos circundados por um citoplasma claro pertencem às células centroacinares, que



constituem a porção intra-acinar dos ductos intercalares. Estas células são encontradas apenas nos ácinos pancreáticos. Ductos intercalares são tributários de ductos interlobulares maiores revestidos por epitélio simples colunar. O ácino pancreático exócrino é constituído por várias células serosas que circundam um lúmen. Estas células são polarizadas, com um núcleo esférico, sendo típicas células secretoras de proteínas. O número de grânulos de secreção (grânulos de zimogênio) presentes em cada célula varia de acordo com a fase digestiva, sendo máximo em animais em jejum (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). No que se refere à estrutura microscópica, as ilhotas apresentam-se sob a forma de aglomerados arredondados de células medindo em média, em ratos, 105,77 μ m a 109,91 μ m (SCHOSSLER, 2004), imersos no tecido pancreático exócrino. Cada ilhota é constituída por células poligonais ou arredondada, por entre as quais existe rica rede de capilares sanguíneos com células endoteliais fenestradas. Envolvendo a ilhota e separando-a do tecido pancreático restante, há uma fina camada de tecido conjuntivo. As células das ilhotas se coram menos intensamente pela hematoxilina-eosina do que as células acinosas, resultando em um aspecto mais claro das ilhotas quando vistas ao microscópio de luz. Distinguem-se, com colorações especiais e, principalmente, por meio da imunocitoquímica, quatro tipos celulares nas ilhotas: as células alfa, beta, delta e F ou PP. As células beta, que sintetizam e secretam insulina, perfazem cerca de aproximadamente 70% de uma ilhota típica. As células alfa, produtoras de glucagon, constituem cerca de 20% do tecido da ilhota, enquanto as delta, consideravelmente menos abundantes (menos de 5%), produzem somatostatina. Um tipo de célula adicional, porém mais raro, a célula PP, também pode aparecer na porção exócrina do pâncreas. Ela contém e secreta um composto ainda não muito bem estudado, chamado de polipeptídeo pancreático (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). As células beta ocupam a região central da ilhota, enquanto as células alfa ocupam geralmente a margem externa. As células delta estão interpostas entre estas e ficam portanto em contato com ambos os tipos. As junções abertas ligam as células alfa umas às outras, as células beta entre si e as células alfa às células beta. Apesar de não haver provas experimentais, esse arranjo pode explicar a atividade secretora sincrônica. Há também junções fechadas entre várias células da ilhota. Esses sítios de íntima aposição ou de fusão verdadeira das membranas plasmáticas de células adjacentes podem afetar a difusão de substâncias para dentro ou para fora dos espaços intercelulares. Esse arranjo



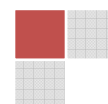
poderia facilitar a comunicação parácrina entre as células alfa, beta e delta (JOHNSON & LEONARD, 2000).

As ilhotas são muito bem vascularizadas; recebem 10% do suprimento sanguíneo pancreático. Pequenas arteríolas penetram a porção central da ilhota e se ramificam em uma rede de capilares com endotélio fenestrado. Estes acabam convergindo em vênulas, que levam o sangue para o manto da ilhota. Essa organização permite que altas concentrações de insulina, da parte central da célula beta, possam banhar as células alfa, delta e PP dos respectivos mantos, sugerindo, mais uma vez, efeitos parácrinos da insulina sobre as outras células insulares.

As ilhotas são inervadas por nervos parassimpáticos, simpáticos e peptidérgicos. As células delta no manto possuem um formato dendrítico e enviam processos que contêm grânulos para a área central das células beta; essas características sugerem uma via neurócrina da regulação intra-insular.

Dentro das células insulares, os hormônios são armazenados em grânulos secretórios com membranas lisas. Esses grânulos secretórios se distribuem mais densamente no lado venoso apical (secretório) da célula. As células insulares também contêm um sistema de microtúbulos que costumam organizar-se em feixes paralelos que separam fileiras lineares de grânulos secretórios. Além disso, microfilamentos contendo miosina e actina formam uma teia adjacente à membrana plasmática em associação com os microtúbulos. Essas estruturas facilitam provavelmente o movimento ativo dos grânulos secretórios na direção da membrana plasmática (BERNE et al., 2000).

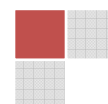
A insulina é um importante hormônio glicorregulador, antilipolítico, anticetogênico e anabolizante (BERNE et al., 2000). O efeito final desse hormônio é reduzir as concentrações sanguíneas de glicose, ácidos graxos e aminoácidos, e promover a conversão intracelular desses compostos em sua forma de armazenamento. A glicose não penetra facilmente em membranas celulares, exceto por alguns tecidos, tais como o cérebro, o fígado e os glóbulos vermelhos e brancos, células que devem ter acesso contínuo à glicose numa base constante. A presença de insulina é crítica para o movimento da glicose através da membrana plasmática na célula. Assim, a insulina promove a produção de glicogênio no fígado, no tecido adiposo e na musculatura esquelética, bem como induz a síntese protéica em tecidos periféricos. Além disso, a insulina diminui as atividades de enzimas hepáticas que estão envolvidas na conversão



de aminoácidos em glicose, aumenta a atividade da lipase lipoprotéica localizada no endotélio de capilares dos tecidos extra-hepáticos, promovendo o movimento de ácidos graxos para o tecido adiposo (CUNNINGHAM, 1993).

A coordenação da secreção de insulina com o estado nutricional, bem como com as demandas flutuantes para a produção de energia, é feita pela estimulação das células beta pelos metabólitos, hormônios e sinais neurais. A manutenção da constância do meio interno é feita pela monitorização direta dos metabólitos circulantes pelas próprias células beta. Essa entrada pode ser sobrepujada ou acentuada por sinais hormonais ou neurais, que prepara o indivíduo para o armazenamento rápido de um influxo de alimento ou para a mobilização, em massa de reservas de combustíveis para permitir resposta adequada às demandas ambientais.

A glicose é o regulador mais importante da secreção de insulina. Os aminoácidos são estímulos importantes também para a secreção, pois o aumento desses compostos após uma refeição rica em proteínas é acompanhado pela secreção aumentada de insulina. Às vezes, o gosto ou o cheiro da comida, ou a expectativa de comer, aumenta também a secreção. As fibras parassimpáticas, do nervo vago, estimulam as células beta liberando a acetilcolina ou peptídeos neurotransmissores, como o peptídeo intestinal vasoativo. A ativação dessa via pode ser iniciada no cérebro e envolve as entradas a partir das terminações sensoriais na boca, no estômago ou no intestino delgado. A secreção de insulina no pâncreas humano é virtualmente desligada pela epinefrina ou pela norepinefrina, que chega as células beta pela circulação ou pelos neurônios simpáticos. As circunstâncias fisiológicas que ativam o sistema nervoso simpático podem assim interromper a secreção de insulina e, dessa maneira, remover o maior impedimento à mobilização dos combustíveis metabólicos necessários para enfrentar uma emergência. As células beta aumentam sua secreção de insulina dentro de 30 segundos de exposição a concentrações aumentadas de glicose e podem sustar a secreção com a mesma rapidez. A questão da maneira pela qual a concentração de glicose é monitorizada e traduzida em intensidade da secreção de insulina ainda não foi completamente respondida. A célula beta tem receptores específicos para o glucagon, a acetilcolina e outros compostos que aumentam a secreção de insulina, mas não parece ter receptores específicos para a glicose. Para afetar a secreção de insulina, a glicose tem que ser metabolizada pela célula beta, indicando que alguma consequência da oxidação

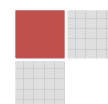


da glicose, em vez da própria glicose, seja o determinante crítico (JOHNSON & LEONARD, 2000).

Vários hormônios, direta ou indiretamente, causam hiperplasia das células beta e aumento subsequente na secreção de insulina, principalmente pelo antagonismo à ação da insulina e aumento da necessidade de insulina por parte dos tecidos periféricos. Esses hormônios incluem: cortisol, hormônio do crescimento, estrogênio-progesterona, lactogênio placentário humano e hormônios tireóideos. A insulina exerce efeito de feedback negativo sobre sua própria secreção, que independe de qualquer efeito sobre a glicose plasmática (BERNE et al. 2000).

A ausência de insulina produz a síndrome denominada diabetes mellitus. As concentrações de glicose sanguínea aumentam devido à menor absorção da glicose por tecidos orgânicos e ao aumento da glicogenólise e da neoglicogênese. O último ocorre em aumento da neoglicogênese hepática devido à maior disponibilidade de aminoácidos, que se verifica como resultado do metabolismo protéico aumentado. A glicose aparece na urina quando a capacidade renal para absorção é ultrapassada; o efeito osmótico resultante leva à diurese ou poliúria. O aumento do metabolismo de triglicerídios leva ao aumento das concentrações de ácidos graxos no sangue e à formação de corpos cetônicos pelo fígado. A deficiência de insulina aumenta a lipólise e, como consequência, aumenta a quantidade de ácidos graxos livres no sangue. Os ácidos graxos são oxidados pelo fígado para formar acetilCoA, que posteriormente pode ser convertida em acetoacetato, beta-hidroxibutirato e acetona, denominados coletivamente como corpos cetônicos. Estes são ânions ácidos e sua presença produz acidose, devido à depleção de íons bicarbonato (CUNNINGHAM,1993).

Os efeitos do diabetes mellitus sobre as ilhotas de Langerhans acarretam: redução no número e no tamanho das ilhotas, mais freqüente no diabetes tipo 1, sobretudo em caso de doença rapidamente progressiva; infiltração leucocitária das ilhotas, podendo ser observada em indivíduos com diabetes tipo 1 por ocasião das manifestações clínicas; degranulação das células beta, refletindo a depleção da insulina armazenada nas células beta já lesadas; no diabetes tipo 2, pode haver uma redução sutil na massa de células da ilhota; a substituição amilóide (composto de fibrilas de amilina derivadas das células beta) das ilhotas no diabetes tipo 2 aparece como deposição de substância amorfa rosada, que surge nos capilares e ao redor deles, bem como entre as

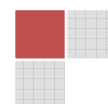


células. Nos estágios avançados, as ilhotas podem estar praticamente obliteradas e, além disso, pode haver fibrose, quase sempre observada nos casos de longa duração de diabetes tipo 2; o aumento no número e no tamanho das ilhotas é particularmente característico de recém-nascidos não-diabéticos de mães diabéticas, em resposta à hiperglicemia materna (COTRAN et al., 2000).

Visto que o controle rigoroso da glicemia constitui até agora a única esperança de evitar as complicações fatais do diabetes mellitus (COTRAN et al., 2000) alguns estudos têm sido realizados com substâncias de ação hipoglicemiante, provavelmente no sentido de recuperar a produção de insulina. Neste sentido, Bolkent et al. (2000) mostraram que ratos diabéticos tratados com o extrato da planta *Beta vulgaris* L. var. *chard* tiveram aumento na secreção de grânulos das células beta (grânulos menos densos), hipertrofia no aparelho de Golgi e aumento no número de células beta das Ilhotas, mostrando que elas foram regeneradas. Assim, a *chard* pode diminuir a glicemia pelo aumento da secreção de insulina das células beta do pâncreas. Kaneto et al. (1999) em um outro estudo, utilizando os antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC) e vitaminas E e C no tratamento do diabetes mellitus, mostraram aumento da massa de células beta nos ratos diabéticos tratados em comparação com os não tratados. Isso sugere que houve supressão de apoptose dessas células, mudando sua taxa de proliferação. Evidenciou-se, assim, o efeito dos antioxidantes sobre a preservação da função das células beta.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparou-se dois extratos de *Azadirachta indica* A. Juss, um aquoso e outro etanólico, com as folhas do Nim cultivadas e fornecidas pela EMBRAPA-CNPAP, que previamente passaram por um processo de estabilização à sombra em um ambiente coberto e ventilado. Após esta secagem e posterior trituração das folhas, foi preparado um extrato etanólico a 70% (p/p) por percolação, até o esgotamento do ativo, numa velocidade de 8 gotas por minuto e em seguida este foi concentrado até a obtenção de um extrato mole. O outro foi um extrato aquoso, utilizando a água destilada para realizar a percolação até o esgotamento do ativo, nas mesmas condições anteriores, e posteriormente este extrato aquoso foi liofilizado.



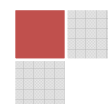
Os animais de experimentação foram 25 ratos albinos, machos, da raça Wistar pesando entre 200 e 250 gramas provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Estes foram divididos em grupos de 5 animais, adaptados em gaiolas no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – UNESP, com temperatura controlada e ciclo de claro-escuro de 12 horas, e alimentados com ração e água “ad libitum”, durante 5 dias.

Após o período de adaptação, os animais foram deixados em jejum de 14 a 16 horas, e coletou-se, através da artéria infraorbitária, amostras de sangue (1,0mL) para a determinação da glicemia pelo método de King e Garner (1947), após leve anestesia inalatória por éter. Em seguida, foi administrada a 20 ratos, 35 mg/kg de estreptozotocina diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,5), intravenosamente, no seio venoso do pênis, com os animais ainda anestesiados. Os outros cinco ratos serviram como grupo controle branco. Após cinco dias, coletou-se sangue, como anteriormente, para a determinação da glicemia. Os animais que apresentaram hiperglicemia foram separados em grupos que receberam tratamento oral uma vez por dia, com os diferentes extratos de *Azadirachta indica*, A. Juss e com estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH).

Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral (0,2mL/100g de animal), através de gavagem, a saber: um grupo controle branco, sem tratamento, recebeu água; um grupo controle branco diabético, sem tratamento, recebeu água; um grupo tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10%; um grupo tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10% e um grupo tratado com estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH). Este procedimento foi realizado durante 30 dias, e no 31º dia, coletou-se a última amostra de sangue, como descrito anteriormente.

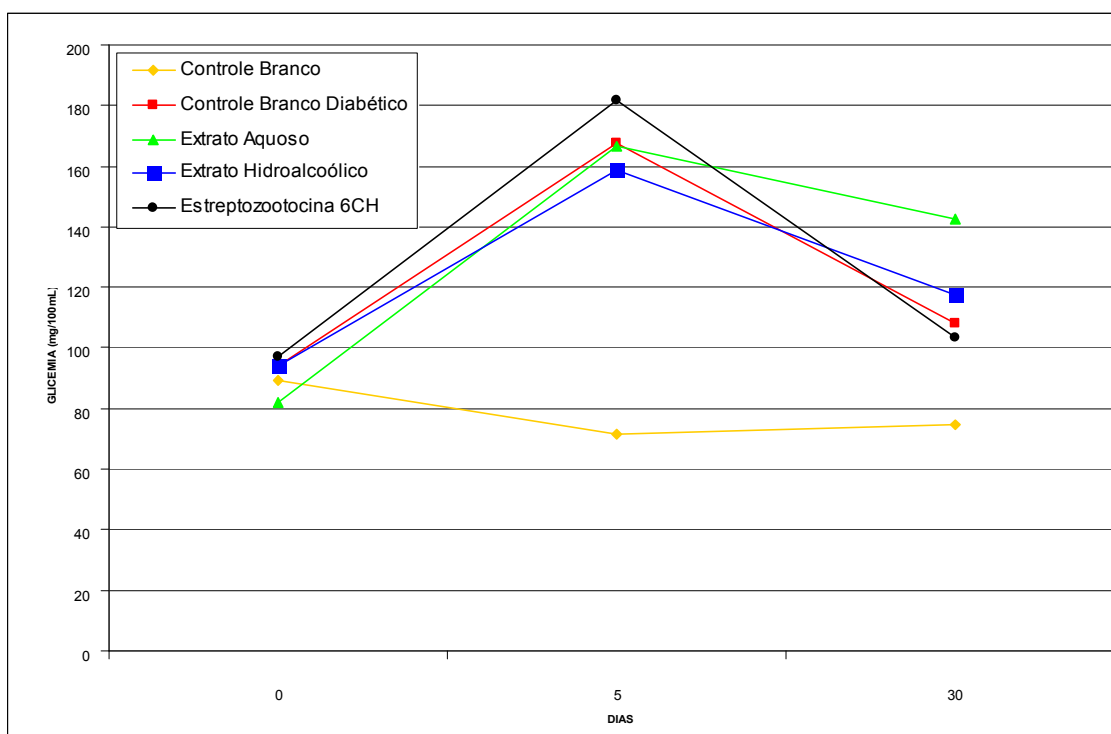
O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições. As médias foram comparadas mediante o teste de Tukey a 5% de probabilidade de acordo com Pimentel Gomes (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

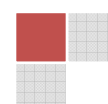


Os níveis glicêmicos determinados no período experimental estão representados no gráfico 1.

Gráfico 1 - Curva glicêmica de ratos machos albinos Wistar, dos grupos controle branco, controle branco diabético, tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A.Juss a 10%, com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A.Juss a 10% e com estreptozotocina 6CH, antes da aplicação de estreptozotocina (tempo zero), no 5º e no 30º dia experimental.

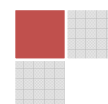


A análise do gráfico 1 indica que as curvas glicêmicas de ratos machos albinos Wistar apresentaram ascensão deste parâmetro metabólico, a partir do tempo zero, ou seja, antes da aplicação de estreptozotocina até o 5º dia pós-aplicação e revelaram-se descendentes desde este último até o 30º dia, para os animais do grupo controle branco diabético, tratados com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A.Juss a 10%, com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, A.Juss a 10% e com estreptozotocina 6CH. Em relação aos animais do grupo controle branco, verifica-se que a curva glicêmica revelou-se levemente descendente do tempo zero até o 5º dia e com discreta ascensão, deste último até o 30º dia experimental.



Os resultados obtidos neste estudo, em relação à glicemia, concordam com os relatos de Furlan (2001) e os de Negri *apud* Marles e Farnsworth (2005), sobre a STZ como agente indutor do diabetes mellitus, observada pela hiperglicemia apresentada no 5º dia após a administração desta droga.

Outras evidências desta pesquisa foram as relacionadas ao tratamento com *Azadirachta indica* A. Juss a 10%, na forma de extratos aquoso e hidroalcoólico (70%), os quais reduziram os níveis glicêmicos do 5º ao 30º dia, porém em menor potência com o uso do extrato aquoso. Estes achados refletem os de alguns autores, a saber: Parshad et al. (1999) encontraram em suas pesquisas sobre os efeitos do extrato aquoso do neem (*Azadirachta indica*, A. Juss), em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, melhora significativa nos pesos dos animais e diminuição da mortalidade, porém, não ocorreu normalização dos níveis de glicose sanguínea; Khosla et al. (2000) observaram efeitos hipoglicemiantes do extrato das folhas e do óleo das sementes de *Azadirachta indica* (L.) em coelhos diabéticos induzidos pela aloxana como tratamento preventivo, 2 semanas antes da indução, e outro grupo tratado por 4 semanas após a indução. O tratamento preventivo inibiu parcialmente o aumento do nível de glicose sanguínea quando comparado aos animais do grupo controle diabético, porém o efeito mais significativo foi observado no grupo tratado durante 4 semanas. Sugeriu que a *Azadirachta indica* (L.) pode ser benéfica para o diabetes mellitus controlando o açúcar sanguíneo ou podendo também ajudar na prevenção do aparecimento da doença; Hussain (2002) ao estudar a reversão da retinopatia utilizando *Azadirachta indica* (L.) em diabetes mellitus induzida por estreptozotocina demonstrou que o tratamento aquoso do neem, revelou um efeito favorável sobre a glicemia e tolerância à glicose, como também reduziu os lipídios séricos e peso corporal. Outros aspectos importantes foram as reversões completas das mudanças anormais da retina e das inflamações das patas dos animais; Negri *apud* Chattopadhyay (2005), após revisão sobre plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes, utilizados para o tratamento do diabetes mellitus, entendeu que o extrato das folhas de *Azadirachta indica*, A. Juss bloqueia significativamente o efeito inibitório da serotonina sobre a liberação de insulina mediada pela glicose e que o efeito hipoglicemiante do extrato pode ser devido à liberação de insulina.



Entretanto, constatou-se que o uso desta planta medicinal no controle do diabetes melittus é duvidoso, considerando-se que a glicemia dos animais do grupo controle branco diabético, no 30º dia, foi menor que a dos grupos de animais tratados com esta planta.

Ressalta-se que os animais do grupo tratado com estreptozotocina 6CH mostraram, no 30º dia, os menores níveis glicêmicos, o que está de acordo com Santos (1990) ao verificar ação hipoglicemiante da aloxana em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (aloxana 6CH) em ratos diabéticos.

CONCLUSÕES

O uso desta planta medicinal no controle do diabetes melittus é duvidoso, considerando-se que a glicemia dos animais do grupo controle branco diabético, no 30º dia, foi menor que a dos grupos de animais tratados com esta planta. Os animais do grupo tratado com estreptozotocina 6CH mostraram, no 30º dia, os menores níveis glicêmicos. A curva glicêmica dos animais do grupo controle branco revelou-se, praticamente, constante durante o período experimental.

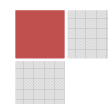
AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro dado pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANSON, E.; ARKY, R.A. Treatment of the obese diabetic. A comparative study of placebo, sulfonylureia and phenformin. **Metabolism Clinical and Experimental**, Duluth, v. 16, n. 3, p. 204-212, Mar. 1967.

ALAM, M.M.; SIDDIQUI, M.B.; HUSSAIN, W. Treatment of diabetes though herbal drugs in rural India. **Fitoterapia**, Milan, v. 61, n. 3, p. 240-242, 1990.



BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.

BARNES et al. Effect of short and long term chlorpropamide treatment on insulin release and blood glucose. **Lancet**, Baltimore, v. 2, n. 7872, p. 69-72, July 1974.

BECKNIEZSEN, H.; PEDERSEN, O.; LINDSKOV, O.H. Increased insulin sensitivity and cellular insulin binding in obese diabetics following treatment with glibenclamide. **Acta Endocrinologica** (kbh), Copenhagen, v. 90, n. 3, p. 451-462, Mar. 1979.

BERNE et al. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1034 p.

BERNHEIM, F., BERNHEIM, M.L.C. & WILBUR, K.M. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 174, p. 257-264, 1948.

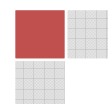
BERTHOUD, E. Le diabete expérimental pour alloxane. **Thésés Med**, Geneve, 1946.

BOLKENT et al. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on pancreatic β cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 73, n. 1-2, p. 251-259, Nov. 2000.

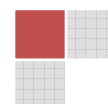
CHATTOPAHYAY, R.R. Comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 67, n. 3, p. 367-372, Nov. 1999.

CHOPRA, R. N. The Nim (*Melia azadirachta* L. Meliaceae) In: Chopra,R.N. **Indigenous drugs of India**. 2 ed. Nova Delhi: Academia Publishers, 1958, p. 360-363.

CHU et al. The pattern on plasma insulin and glucose to meals and fasting during chlorpropamide therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 68, n. 4, p. 757-767, Apr. 1968.



- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins**: Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400 p.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 528 p.
- DE MOOR, P. Deabète alloxanique, **Masson**, ed. Paris, 1953.
- DI STASI, L. C. **Plantas Medicinai**s: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. 1. ed. São Paulo: Edunesp, 1996. 230 p.
- DUNN et al. Necrosis of the islets of Langer-Hans produced experimentally. **Journal of Pathology and Bacteriology**, Edinburgh, v. 55, n. 3, p. 245-257, July 1943.
- FARMACOPÉIA homeopática brasileira. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.
- FELDMAN, J.M.; LEOVITZ, H.E. Endocrine and metabolic effects of glibenclamide. Evidence for an extrapancreatic mechanism of action. **Diabetes**, v. 20, p. 745-755, 1971.
- FURLAN, M.M.D.P. A estrepto-zootocina como agente diabetogênico. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 197-201, mai./ago. 2001.
- GROOP, L.; HARNO, K. Diurnal pattern of plasma insulin and blood glucose during glibenclamide and glipizide therapy in elderly diabetics. **Acta Endocrinologica**, Copenhagen, v. 239, p. 44-51, 1980.
- HETCH, A.; GERSHBERG, H.; HULSE, M. Effect of chlorpropamide treatment on insulin secretion in diabetics: its relationship to the hypoglycemic effect. **Metabolism: Clinical and Experimental**, New York, v. 22, n. 5, p. 723-732, May 1973.



HUSSAIN, H.E.M.A. Reversal of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using traditional Indian anti-diabetic plant, *Azadirachta indica* (L.). **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 17, n. 2, p. 115-123, 2002.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000, 725 p.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004, 488 p.

KANETO et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. **Diabetes**. v. 48, n. 12, p. 2398-2406, Dec. 1999.

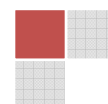
KHOSLA, P.; BHANWRA, S.; SINGH, J.; SETH, S.; SRIVASTAVA, R.K. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, New Delhi, v. 44, n. 1, p. 69-74, Jan. 2000.

KING, E.J. & GARNER, R.J. Colorimetric determination of glucose. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 1, n. 1, p. 30-33, Nov. 1947.

KOCH, C.K. El arbor de la India (*Azadirachta indica*) y su utilización potencial en el Ecuador con especial referencia a las propiedades plaguicidas de sus extractos. **Equador: Convênio GTZ/MAG**. 15p., 1990.

MARTINS et al. **Plantas Medicináveis**, Viçosa: Imprensa Universitária-UFV, 1994. 220 p.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, abr./jun. 2005.



PARSHAD, O.; WEST, E.; GARDNER, M. Effects o aqueous extract of neem (*azadirachta indica* a. juss) on streptozotocin induced diabetic rats. In: ANNUAL RESEARCH CONFERENCE, 8., 1999, Kingston. **Eighth Annual Research Conference 1999**. Mona: University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences, 1999.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Pimentel Gomes, 2000. 477 p.

RAGASA et al. Tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica* .**Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 555-558, 1997.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

SANTOS, E. Action hypoglycémiant de l'alloxane 6CH sur les rats diabétiques alloxaniques. **Homeopathie**, v. 3, p. 38-39, 1990.

SAXENA, R. C. Scope of Nim developing countries. **Paper presented at World Nim conference Souvenir-Bengalore**, Nairobi, p. 24-28, 1993.

SCHMUTTERER, H. Properties and Potential of natural pesticides from the Nim tree (*Azadirachta indica*). **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 35, p. 271-297, 1990.

SCHOSSLER et al. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1821-1825, nov./dez. 2004.

TOLOSA et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 331 p.

