

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DO *CISSUS SICYOIDES* L. (VITACEAE)**Flávio Luís Beltrame, Juliano Luis Sartoretto, Roberto Barbosa Bazotte, Roberto Nakamura Cuman e Diógenes Aparício Garcia Cortez**

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá - PR

Luiz Claudio Fernandes e Osvaldo Tchaikovski

Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, 81530-971 Curitiba - PR

Recebido em 6/10/00; aceito em 8/2/01

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF THE ANTIDIABETIC POTENTIAL OF *CISSUS SICYOIDES* L. (VITACEAE). The effect of hydroalcoholic extracts (HE) obtained from leaves of *Cissus sicyoides* (CS) on glucose tolerance (GT) was investigated in rats treated with dexametasone (DEX). Our results showed that HE intensified the decreased GT promoted by (DEX). Additionally, the flavonoids kaempferol 3-O-rhamnoside and quercetin 3-O-rhamnoside, obtained from aerial parts of CS, were used to study the incorporation of glucose to glycogen in soleo muscle. The results showed that both flavonoids did not show effect on glycogen synthesis. Thus, our data, in contrast to popular believe, did not reveal antidiabetic activity to SC.

Keywords: *Cissus sicyoides*; Vitaceae; antidiabetic potential; flavonoids.

INTRODUÇÃO

O gênero *Cissus* L., o mais vasto da família Vitaceae, é constituído de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical¹.

Foram isolados alcalóides quinolizidínicos dos pigmentos dos frutos de *Cissus rheifolia* e uma mistura de esteróides e flavonóides^{2,3} das folhas e raízes. A partir da parte aérea do *Cissus quadrangularis* foram isolados triterpenóides⁴; enquanto que do *Cissus pallida* foi isolado o pallidol, que apresentou atividade antifúngica⁵. A partir dos pigmentos dos frutos do *Cissus sicyoides* (CS) foram isolados antocianinas⁶.

Na medicina popular, o chá das partes aéreas do CS, conhecido como cortina-japonesa, uva brava e anil trepador é utilizado como antiinflamatório, antiepilético, antihipertensivo, antitérmico, antireumático e antidiabético⁷.

No norte do Paraná, o CS é conhecido como insulina⁸ e o chá das partes aéreas é utilizado no tratamento do diabetes mellitus (DM) tipo 2, cuja prevalência alcança 7% da população acima de 40 anos. O uso popular do CS ocorre concomitantemente ou em substituição ao tratamento médico convencional. Porém, verificou-se a inexistência de estudos que comprovem o potencial antidiabético desta planta. Outro aspecto preocupante é o fato de que o DM tipo 2, embora assintomático, quando não tratado adequadamente, leva ao desenvolvimento de complicações crônicas (neuropatia diabética, dislipidemia, insuficiência renal etc.), que comprometem a qualidade de vida do paciente diabético⁸. Assim, o presente trabalho tem como objetivo investigar o potencial antidiabético do chá e dos compostos ativos isolados do CS.

PARTE EXPERIMENTAL**Estudos Químicos**

Procedimentos Experimentais Gerais. Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro Jasco IR700. Os espectros de RMN de ¹H (400 MHz) e de ¹³C (100,6 MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker WH 400, utilizando-se CD₃OD como solvente e TMS como referência interna. Para a obtenção de espectro no ultravioleta foi utilizado o aparelho

Varian Cary 1E. Os espectros de massa por eletrospray foram obtidos em espectrômetro VG Platform II, operando a 70 eV.

As separações cromatográficas em coluna por adsorção foram realizadas utilizando-se sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck), enquanto que para as cromatografias em camada delgada analítica, utilizou-se sílica-gel GF₂₅₄ Merck.

Material vegetal. As partes aéreas do *Cissus sicyoides* L. foram coletadas na cidade de Maringá (PR) em Julho de 1997. As exsiccatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá (Código HUM 4708).

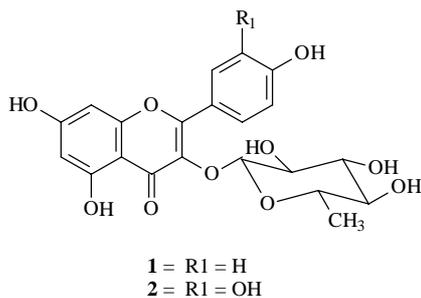
Obtenção dos extratos. As partes aéreas foram secas em estufa de ar circulante (45°C), enquanto parte das folhas foram separadas e trituradas em moinho de facas Marconi MA340.

O pó das folhas (200g) foi extraído com hidroalcoólico (1:1) por turbólise⁹. O filtrado foi concentrado a pressão reduzida e liofilizado obtendo-se 25,3 g de extrato (EH).

O pó das partes aéreas (300g) foi macerado com metanol a temperatura ambiente por oito dias. Após a destilação do solvente sob temperatura reduzida, obteve-se 33,9 g do extrato metanólico (EM).

Extração e fracionamento. O EM (10g) foi adicionado de 800 mL de metanol:água (1:1) e submetido a partição líquido-líquido com 800 mL de hexano e acetato de etila, respectivamente. Após a evaporação do solvente sob pressão reduzida, obteve-se os extratos hexânico (1,3g), acetato de etila (3,8g) e aquoso (4,8g). O fracionamento foi direcionado para o isolamento de flavonóides, através da interpretação dos espectros de UV e RMN de ¹H dos extratos e frações obtidas. O extrato aquoso com absorção no UV característica de flavonóides¹⁰, foi submetido a cromatografia a vácuo adsorvido em Avicel[®] utilizando-se como fase móvel: hexano, hexano-CHCl₃ (1:1), CHCl₃, CHCl₃-AcOEt (1:1), AcOEt e MeOH. A fração MeOH foi cromatografada em coluna de sílica gel, utilizando-se mistura de hexano, CHCl₃:AcOEt e AcOEt:MeOH como eluentes. Esse fracionamento resultou no isolamento das substâncias **1** (1,6 mg) e **2** (1,2 mg).

Os flavonóides (**1**) e (**2**) foram identificados pela análise dos espectros de UV, IV, EM e aplicação de técnicas bidimensionais de RMN(COSY, HSQC, HMB), comparando-se com os dados registrados na literatura^{13,14}.



Canferol 3- α -ramínosídeo (1). Óleo amarelo viscoso. UV (MeOH) λ_{\max}/nm (log ϵ): 346(5,22), 268(8,97). IV: $\text{vmáx.}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3573, 3005, 2919, 1612. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) δ : 7,76 (d, $J = 9,0$ Hz, H-2' e 6'), 6,93 (d, $J = 9,0$ Hz, H-3' e 5'), 6,37 (d, $J = 2,1$ Hz, H-8), 6,19 (d, $J = 2,1$ Hz, H-6), 5,36 (d, $J = 1,8$ Hz, H-1''), 4,2 (dd, $J_1 = 3,3$ e $J_2 = 1,8$ Hz, 2xH-2''), 3,69 (m, H-3''), 3,36 (m, H-4'' e 5''), 0,91 (d, $J = 5,7$ Hz, CH_3). RMN de ^{13}C (100,6 MHz, CD_3OD) δ : 179,0 (C-4), 163,5 (C-7), 162,2 (C-5), 161,8 (C-4'), 159,5 (C-2), 158,8 (C-9), 136,4 (C-3), 132,0 (C-2'), 132,0 (-6'), 122,8 (C-1'), 116,7 (C-3'), 116,7 (-5'), 106,0 (C-10), 103,6 (C-1''), 99,9 (C-6), 94,8 (C-8), 73,2 (C-4''), 72,2 (C-3''), 72,1 (C-2''), 71,9 (-5''), 17,3 (CH_3). EM: m/z (int. rel.): $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 455 (100), 433 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (45), 434 (12), 429 (12), 413 (41), 365 (29), 287 (57), 173 (77), 172 (67), 150 (74), 121 (14), 71 (12).

Quercetina 3- α -ramínosídeo (2). Óleo amarelo viscoso. UV (MeOH) λ_{\max}/nm (log ϵ): 349(8,10), 297(5,39), 255(11,65). IV: $\text{vmáx.}^{\text{NaCl}}$ cm^{-1} : 3437, 3007, 2924, 2360, 1655, 1606. RMN de ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ : 7,50 (d, $J = 2,4$ Hz, H-2'), 7,39 (dd, $J_1 = 8,4$ e $J_2 = 1$ Hz, 2xH-6'), 6,99 (d, $J = 8,4$ Hz, H-5'), 6,48 (d, $J = 1,8$ Hz, H-8), 6,27 (d, $J = 1,8$ Hz, H-6), 5,51 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1''), 4,21 (dd, $J_1 = 3,3$ e $J_2 = 8$ Hz, 2xH-2''), 3,73 (dd, $J_1 = 9,0$ e $J_2 = 3$ Hz, H-3''), 3,42 (m, H-5''), 3,35 (m, H-4''), 0,91 (d, $J = 1,5$ Hz, CH_3). RMN de ^{13}C (100,6 MHz, CD_3OD) δ : 179,9 (C-4), 166,1 (C-7), 163,5 (C-5), 158,8 (C-2), 158,0 (C-9), 150,0 (C-4'), 146,6 (C-3'), 136,4 (C-3), 106,0 (C-10), 123,1 (C-1'), 123,1 (C-6'), 117,0 (C-2'), 116,5 (C-5'), 103,7 (C-1''), 99,9 (C-6), 94,8 (C-8), 73,3 (C-4''), 72,2 (C-3''), 72,1 (C-2''), 72,0 (C-5''), 17,6 (CH_3). EM: m/z (int. rel.): $[\text{M} + \text{H}]^+$ 449(70), 471 (27), 413 (59), 303 (100), 284 (50), 173 (84), 166 (80).

Estudos farmacológicos

Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico (EH) de folhas do CS sobre a tolerância à glicose intravenosa em animais tratados com Decadron® (dexametasona, DEX). O teste foi realizado empregando-se ratos machos da linhagem Wistar. Neste estudo foram comparados quatro diferentes grupos: a) tratados uma vez ao dia, durante quatro dias, com EH obtido de folhas do CS (1,0 g/Kg), administrado pela via intragástrica (grupo CS); b) tratados uma vez ao dia, durante quatro dias, com DEX (0,1 mg/kg), administrado pela via subcutânea (grupo DEX); c) tratados durante quatro dias com DEX + CS (grupo experimental); d) animais não tratados (grupo controle).

Vinte e quatro horas após a última dose de DEX, os animais em jejum de 12 horas foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Os animais mantidos em jejum foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® 3%, 40 mg/Kg) por via intraperitoneal. Após laparotomia e exposição da veia cava inferior, foi coletada uma amostra de 0,5 mL de sangue correspondendo à glicemia basal (T_0). Administrou-se a seguir glicose (0,5 g/Kg) por esta mesma via e foram coletadas amostras de 0,5 mL de sangue nos tempos 5 (T_5), 10 (T_{10}), 20 (T_{20}), 30 (T_{30}) e 60 (T_{60}) min após a injeção. Estas amostras de sangue foram centrifugadas (5 min/ 3000 rpm) e a glicemia determinada pelo método da glicose oxidase (kit Labtest®),

utilizando-se alíquotas de 20 μL de soro. A área sob a curva, apresentada na Figura 1, calculada a partir dos valores de glicemia obtidas para os tempos T_0 , T_5 , T_{10} , T_{20} , T_{30} e T_{60} foram determinadas pelo programa Graphpad Prisma®.

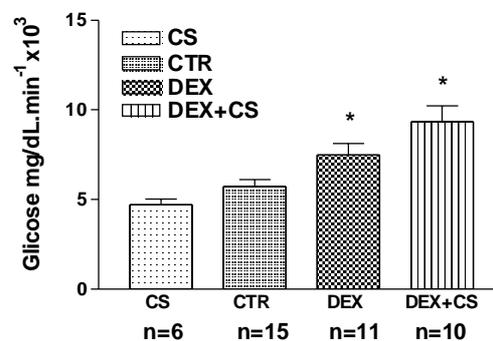


Figura 1. Área sob curva calculada a partir dos valores de glicemia obtidos nos tempos 0, 5, 10, 20, 30 e 60 min após administração intravenosa de glicose em ratos tratados com extrato bruto de *Cissus sicyoides* (CS), ratos controle (CTR), ratos tratados com dexametasona (DEX) e ratos tratados com associação de DEX + CS. * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo CRT.

Determinação da síntese de glicogênio. Utilizou-se ratos machos Wistar, pesando 180 g, os quais foram sacrificados por deslocamento cervical. O músculo sóleo foi retirado, pesado na balança Denver Instrument Company, modelo AA-200 e pré-incubado em banho com agitação tipo Dubnoff por 30 min em meio Krebs-Ringer contendo glicose 5,6 mM, BSA 1%, gaseificando-se continuamente com O_2/CO_2 (95%/5%), a 37 °C. Em seguida, os músculos foram transferidos para frascos contendo Krebs-Ringer, glicose 5,6 mM, BSA 1% + 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -Glicose (Amersham® na concentração de 306 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$) analisados em cintilador Beckman®, modelo LS6500. Neste estudo comparamos os seguintes grupos: a) controle (incubado na ausência de flavonóides ou insulina); b) controle positivo (incubado na presença de 1000 $\mu\text{U}/\text{ml}$ de insulina); c) incubado na presença do flavonóide **1** nas concentrações de 150, 300 e 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Ao final de 1h de incubação¹¹, os músculos foram retirados e congelados em nitrogênio líquido para análise da síntese de glicogênio¹². Em uma segunda série de experimentos foi investigado o flavonóide **2** nas concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quando foi empregado o mesmo ensaio biológico descrito anteriormente, com a diferença de que foi utilizado 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -Glicose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro ensaio biológico investigou-se o efeito do tratamento com extrato **EH** das folhas do **CS** sobre a tolerância à glicose intravenosa em animais tratados com **DEX**. Como o tratamento com **DEX** (1 g/kg) diminui a tolerância à glicose, a associação **DEX** + extrato **EH** de folhas de **CS** teve como objetivo investigar a possibilidade do **CS** promover melhoria na tolerância à glicose.

Como mostram as áreas sob a curva da Figura 1, há uma maior glicemia ($p < 0,05$) no grupo **DEX** quando comparado ao controle. Este efeito foi intensificado quando a **DEX** foi associada ao **CS**. Assim, os dados obtidos, ao contrário do que observou-se anteriormente para a *Stévia rebaudiana*¹⁶, sugerem que o extrato de **CS** aumenta o grau de intolerância à glicose promovida pela **DEX**, sugerindo um efeito diabético e não antidiabético como acredita a população usuária desta planta.

Como o tratamento com o **EH** promoveu discreta redução da glicemia no tempo zero (basal), em relação ao grupo controle (resultados não apresentados), associado ao fato de que alguns flavonóides apresentam propriedades antidiabéticas¹⁵, o fracionamento foi direcionado para o isolamento destas

substâncias, resultando na obtenção do canferol 3- α -ramínosídeo (**1**) e quercetina 3- α -ramínosídeo (**2**). O extrato de acetato de etila não foi fracionado por não apresentar absorção característicos de flavonóides no espectro de UV.

Os flavonóides **1** e **2** foram submetidos a ensaios *in vitro* para avaliar uma possível atividade insulínogênica. Para isto, o efeito dos flavonóides **1** e **2** na síntese do glicogênio foi investigado. Como mostra a Figura 2, diferentemente da insulina (controle positivo), os flavonóides **1** e **2** não estimularam a síntese do glicogênio. Ainda em relação à Figura 2, as diferenças nas taxas de síntese de glicogênio do grupo controle (**con**), nos dois diferentes ensaios, refletem a quantidade de [U-¹⁴C]-Glicose empregada em cada ensaio biológico, ou seja, 0,1 e 0,3 μ Ci/ml respectivamente para os flavonóides **1** e **2**.

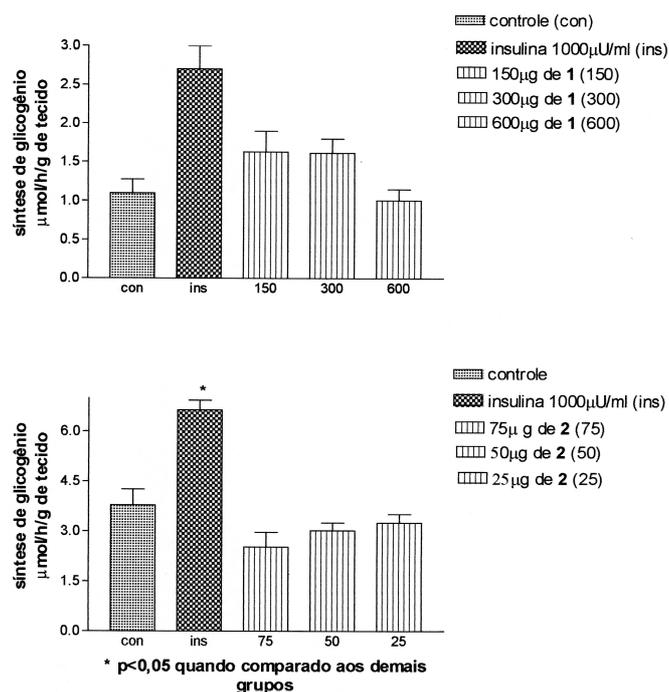


Figura 2. Síntese de glicogênio em músculo sóleo de ratos incubados com a substância **1** e substância **2**.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura científica, que aponta um grande número de compostos com potencial antidiabético, porém não confirmados em estudos laboratoriais¹⁷. Assim, embora não tenhamos obtido efeito antidiabético, nossos resultados são relevantes, considerando o amplo consumo desta planta pela população. Este hábito, incentivado pela mídia, dentro

da idéia “o que é natural é bom/o que é sintetizado em laboratório é ruim”, tem incitado nossa população ao emprego de plantas no tratamento do DM, facilitando o desenvolvimento de complicações crônicas (hipertensão, impotência sexual etc.) que ocorrem em proporção direta à ineficácia do tratamento.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu auxílio concedido pelo CNPq (processo: 520446/97-6). Os autores agradecem também a Professora M. Furlan do Instituto de Química da UNESP pela realização dos espectros de massa.

REFERÊNCIAS

- Correa, M. Pio.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*; Imprensa Nacional; Rio de Janeiro, 1926; Vol. IV, p 130.
- Saifah, E.; Kelley, C. J.; Leary, J.D.; *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 353.
- Saifah, E.; Vasiriroj, V.; *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 328.
- Bhutani, K. K.; Kapoor, R.; Atal, C. K.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 407.
- Khan, M. A.; Nabi, S. G.; Prakash, S.; Zaman, A.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1945.
- Toledo, M. C. F.; Reyes, F. G. R.; Iaderoza, M.; Francis, F. J.; Draetta, I. S.; *J. Food. Sci.* **1983**, *48*, 1368.
- Silva, G. A.; Muradin, L. B. A.; Akisue, G.; Ferro, V. O.; *Rev. Bras. Farmacognosia* **1996**, *1*, 96.
- Baker, J. G.; *Flora Tropical da África*, São Paulo, 1968; Vol. I, p 385.
- Bazotte, R. B.; *Infarma* **1995**, *4*, 8.
- Voigt, R.; Bornschein, M.; *Tratado de Tecnologia Farmaceutica*; Editorial Acribia; Zaragoza, 1979; p 499.
- Harbone, J. B.; Willians, C. A. In *The Flavonoids*; Harbone, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. Ed.; Chapman & Hall. London, 1975; p 376.
- Nakano, K.; Takatani, M.; Tomimatsu, T.; Toshihiro N.; *Phytochemistry* **1983**, *12*, 2831.
- Markhan, K. R.; Chari, V. M.; Marby, T. J.; In *The Flavonoids: Advances in Research*; Harbone, J. B.; Marby, T. J. Ed.; Chapman & Hall, London, 1982.
- Foot, E.; Bliss, T.; Fernandes, L. C.; Da Costa, C.; Leighton, B.; *Mol. Cell. Biochem.* **1992**, *109*, 157.
- Espinal, J.; Dohm, G. L.; Newsholme, E. A.; *Biochem. J.* **1983**, *212*, 453.
- Curi, R.; Alvarez, M.; Bazotte, R.B.; Botion, L.M.; Godoy, G. L.; Bracht, A.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1986**, *19*, 771.
- Konig, G. M.; Wright, A. D.; Keller, W. J.; Robert, L. J.; Bates, S.; Day, C.; *Planta Med.* **1988**, *64*, 612.
- Williams, G.; Pickup, J.C.; In *Textbook of Diabetes*; Pickup, J. C.; Williams, G. Ed.; Blackwell Scientific Publications, London, 1991.