



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Alice Osório Paulino

**Efeito antinociceptivo do extrato das folhas de *Cissus Verticillata* na Nocicepção
relacionada à diabetes**

Florianópolis - SC
2019

Alice Osório Paulino

**Efeito antinociceptivo do extrato das folhas de *Cissus Verticillata* na Nocicepção
relacionada à diabetes**

Dissertação apresentada ao Programa de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre Profissional em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares Santos

Florianópolis - SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Osório Paulino, Alice

Efeito antinociceptivo do extrato das folhas de *Cissus verticillata* na nocicepção relacionada à diabetes / Alice Osório Paulino; orientador, Adair Roberto Soares Santos, 2019.

53 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. I. Adair Roberto Soares Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

Alice Osório Paulino

Efeito antinociceptivo do extrato das folhas de *Cissus Verticillata* na Nocicepção relacionada à diabetes

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Maique Weber Biavatti, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Luiz Gashnar Moreira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alcíbia Helena de Azevedo Maia, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Profissional em Farmacologia obtido pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador

Florianópolis, 15 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha existência e oportunidades para alcançar meus objetivos, por sempre me dar força e a ser a luz para meu caminho.

Ao meu pai Almir e mãe Nilza pelo apoio e o incondicional amor; a minha irmã Laís e minhas tias por sempre me apoiarem e nunca me deixar desistir.

Ao meu filho Igor pela paciência que teve com a mamãe nos inúmeros dias de estudos e viagens.

Ao meu orientador Adair pela orientação e paciência, e todo o pessoal do Laboratório pela paciência e carinho que me receberam e me ajudaram, em especial Scheila e Thayza. Agradeço também pelo aprendizado e confiança.

Ao Prof. Dr. Louis P. Sandjo e a Larissa Faqueti e Layzon do Laboratório de Farmacognosia/CIF/CCS pela ajuda e tempo disponibilizado.

Aos meus colegas e amigos do Mestrado Profissional de Farmacologia, pelo companheirismo e momentos alegres.

Aos professores do Mestrado por todo o conhecimento proporcionado.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma maneira, me apoiaram nesta etapa da minha vida.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”

(Aristóteles)

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus é uma doença crônica, que causa muitas complicações, entre elas a dor neuropática que acomete cerca de 40 a 50% dos pacientes comprometendo a sua qualidade de vida. Estudos vêm correlacionando o aparecimento da dor neuropática e outras complicações do diabetes com um aumento na formação de produtos de glicação avançada (AGES) e seus precursores, sendo o metilglioxal (MG) o principal deles. As diretrizes de dor neuropática diabética sugerem que o controle adequado da glicemia possa evitar ou retardar o aparecimento da doença. A *Cissus verticillata* é uma planta conhecida no Brasil como Insulina Vegetal, muito utilizada pela população para controle da glicemia. **Objetivo:** Avaliar o perfil fitoquímico e o efeito antinociceptivo do extrato aquoso da folha de *Cissus verticillata* em modelos experimentais de dor (nocicepção) associado à diabetes em camundongos. **Material e Método:** Foi verificado o teor de umidade de amostra de folhas frescas e secas de *Cissus verticillata*, posteriormente foram realizados dois extratos aquosos, um com as folhas frescas e outro com as folhas secas. Após o preparo dos extratos, estes passaram pelo processo de liofilização, onde se obteve o extrato seco. Foi traçado o perfil fitoquímico por meio de Cromatografia líquida de ultra eficiência em massas sequencial (UPLC/MS/MS). A avaliação do efeito antinociceptivo foi realizado no modelo experimental de dor (nocicepção) química induzida pela injeção intraplantar de metilglioxal, capsaicina e cinamaldeído em camundongos. Para tal, foram utilizados camundongos Suiços tratados com o extrato aquoso das folhas secas de *Cissus verticillata* (EACv) por via intragástrica, nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg uma hora antes da realização dos experimentos **Resultados:** De acordo com a análise fitoquímica, as folhas de *Cissus verticillata* apresentam compostos que corroboram com achados na literatura. O EACv demonstrou significativa diminuição da nocicepção causada pelo metilglioxal. Além disto, o EACv (30 e 300 mg/kg) reduziu a nocicepção causada pela capsaicina e cinamaldeído, sendo mais eficaz na nocicepção induzida pela capsaicina. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo, indicam que o extrato aquoso de *Cissus verticillata* apresenta importante efeito antinociceptivo (analgésico) no modelo de nocicepção causado pelo metilglioxal que está associado a dor relacionada a diabetes. Além disto, a *Cissus verticillata* foi efetiva no modelo de nocicepção causada pela capsaicina e cinamaldeído, sugerindo um mecanismo de ação relacionado aos receptores TRPV1 e TRPA1. Esses resultados corroboram os achados descritos na literatura e abrem, portanto, novas perspectivas para o uso da *Cissus verticillata* no tratamento da dor, em especial da dor associada a diabetes.

Palavras-chave: Diabetes. Metilglioxal. Capsaicina. Cinamaldeído. *Cissus verticillata*. Dor. Nocicepção. Camundongos.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus is a chronic disease that causes many complications, including neuropathic pain that affects about 40% to 50% of patients impacting their quality of life. Studies have correlated the onset of neuropathic pain and other complications of diabetes with an increase in the formation of advanced glycation end products (AGES) and their precursors, with methylglyoxal (MG) being the main one. The guidelines for diabetic neuropathic pain suggest that adequate glycemic control may prevent or delay the onset of the disease. The *Cissus verticillata* is a plant known in Brazil as the vegetable insulin and it is widely used by the population to control the glycemic levels. **Objective:** To evaluate the phytochemical profile and antinociceptive effect of the aqueous extract of the *Cissus verticillata* leaf in experimental models of pain (nociception) associated with diabetes in mice. **Material and Method:** The moisture content of fresh and dried leaves of *Cissus verticillata* was verified, then two aqueous extracts were performed, one with the fresh leaves and the other with the dry leaves. After the preparation of the extracts, they underwent the lyophilization process, in which the dried extract was obtained. The phytochemical profile was traced by Ultra performance liquid chromatography in sequential masses (UPLC / MS / MS). The evaluation of the antinociceptive effect was performed in the experimental model of chemical pain (nociception) induced by the intraplantar injection of methylglyoxal, capsaicin and cinnamaldehyde in mice. For this, Swiss mice were used and treated with the aqueous extracts of dry leaves of *Cissus verticillata* (EACv) by intragastric administration at the doses of 30, 100, 300 and 1000 mg/kg one hour before performing the experiments. **Results:** According to the phytochemical analysis, the leaves of *Cissus verticillata* show compounds that corroborate with findings from the literature. EACv demonstrated a significant decrease in nociception caused by methylglyoxal. In addition, EACv (30 and 300 mg/kg) reduced nociception caused by capsaicin and cinnamaldehyde, being more effective in nociception induced by capsaicin. **Conclusion:** The results of the present study indicate that the aqueous extract of *Cissus verticillata* has an important antinociceptive effect (analgesic) in the model of nociception caused by methylglyoxal that is associated with pain related to diabetes. In addition, *Cissus verticillata* was effective in the nociception model caused by capsaicin and cinnamaldehyde, suggesting a mechanism of action related to TRPV1 and TRPA1 receptors. These results corroborate the findings described in the literature and therefore open new perspectives for the use of *Cissus verticillata* in the treatment of pain, especially pain associated with diabetes.

Keywords: Diabetes. Methylglyoxal. Capsaicin. Cinnamaldehyde. *Cissus verticillata*. Pain. Nociception. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de nocicepção	15
Figura 2 - Rotas de formação de produtos finais da glicação avançada.....	16
Figura 3 - <i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C. E. Jarvis.	22
Figura 4 - Variação das folhas de <i>Cissus verticillata</i>	24
Figura 5 - <i>Cissus verticillata</i> (L.).....	25
Figura 6 - Amostra de exsicata <i>Cissus verticillata</i>	28
Figura 7 – Processo de secagem das folhas de <i>Cissus verticillata</i>	29
Figura 8 – Preparação do extrato aquoso das folhas de <i>Cissus verticillata</i>	30
Figura 9 - Extrato seco obtido a partir das folhas secas (A) e frescas (B) de <i>Cissus verticillata</i>	36
Figura 10 - Cromatograma UPLC-ESI (+) - QToF BPI do extrato aquoso de <i>Cissus verticillata</i>	36
Figura 11 - Efeito da <i>Cissus verticillata</i> no comportamento nociceptivo induzido por metilglioxal em camundongos	40
Figura 12 - Efeito da <i>Cissus verticillata</i> no comportamento nociceptivo induzido por capsaicina em camundongos fêmeas.....	41
Figura 13 - Efeito da <i>Cissus verticillata</i> no comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído em camundongos fêmeas	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de umidade da folha fresca e seca de <i>C. verticillata</i>	35
Tabela 2 - Compostos identificados no extrato de <i>Cissus verticillata</i> por UPLC-HRMS e dados de MS/MS.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP-4	Dipeptidil Petidase 4
EACv	Extrato Aquoso de <i>Cissus verticillata</i>
GLP-1	Peptídio 1 semelhante ao glucagon
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução
IDF	International Diabetes Federation (inglês)
MG	Metilglioxal
MS	Ministério da Saúde
NMDA	N-metil D-aspartato
NPH	Neutral Protamine Hagedorn
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBD	Sociedade Brasileira de Diabete
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SIAB	Sistema de Informação da Atenção Básica
SUS	Sistema Único de Saúde
TRPs	Canais de potenciais transitórios
UNESC	Universidade do Extremo Sul Catarinense
UPLC/MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência de Massa Sequencial
UPLC-HRMS	UPLC com Detecção por Espetrometria de Massa de Elevada Resolução

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DIABETES MELLITUS	13
1.1.1	Terapias Medicamentosas	18
1.1.2	Terapias alternativas para controle da glicemia	20
1.2	CISSUS.....	22
1.2.1	Descrição botânica	23
1.2.2	Componentes Químicos.....	26
1.2.3	Atividade Farmacológica da <i>Cissus verticillata</i>.....	26
1.3	OBJETIVOS.....	27
1.3.1	Objetivo Geral.....	27
1.3.2	Objetivos Específicos.....	27
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
2.1	PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	28
2.1.1	Coleta e identificação do material botânico	28
2.1.2	Processos de secagem	28
2.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>CISSUS VERTICILLATA</i>	29
2.3	PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>CISSUS VERTICILLATA</i>	30
2.4	LIOFILIZAÇÃO	30
2.5	ANÁLISE FITOQUÍMICA	31
2.5.1	Análise qualitativa do extrato por UPLC-HRMS.....	31
2.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA (ANALGÉSICA).....	32
2.6.1	Animais.....	32
2.6.2	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de metilglioxal	32
2.6.3	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	33
2.6.4	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído	33
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
3	RESULTADOS.....	35

3.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE <i>CISSUS VERTICILLATA</i>	35
3.2	LIOFILIZAÇÃO.....	35
3.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA	36
3.3.1	Composição química do extrato aquoso obtido a partir das folhas secas de <i>C. verticillata</i>.....	36
3.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA (ANALGÉSICA).....	40
3.4.1	Efeito do extrato aquoso das folhas secas de <i>Cissus verticillata</i> (EACv) na nociceção induzida pelo metilglioxal	40
3.4.2	Efeito da <i>Cissus verticillata</i> no comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina	41
3.4.3	Efeito da <i>Cissus verticillata</i> no comportamento nociceptivo induzido pelo cinamaldeído	41
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus é uma doença crônica que se caracteriza por um distúrbio metabólico onde há uma diminuição ou ausência da produção de insulina pelas células pancreáticas do tipo beta, entre outros processos patogênicos envolvidos como, resistência à ação da insulina. A insulina é um hormônio responsável pelo transporte de glicose da corrente sanguínea para as células do corpo, onde na célula a glicose é transformada em energia (SBD, 2019; KATZUNG; MASTERS; TREVER, 2014, SBEM, 2014; GROSS et al., 2002).

A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas como: cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica. Os sintomas como: fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e vulvar, balanopostite e infecções de repetição, levam à suspeita clínica da doença (BRASIL, 2006b; GROSS et al., 2002).

O diagnóstico tardio é feito a partir de complicações crônicas como neuropatia, retinopatia ou doença cardiovascular aterosclerótica. O diagnóstico da diabetes baseia-se nas alterações da glicose plasmática de jejum ou após uma sobrecarga de glicose por via oral (GROSS et al., 2002; CARVALHO, 2005; MEDEIROS et al., 2016).

Atualmente, a diabetes mellitus é classificada em quatro categorias: 1) Diabetes mellitus tipo 1, caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas, levando a ausência total da insulina, sendo necessário a administração de insulina exógena, compreendendo 10% dos casos de diabetes no país; 2) Diabetes mellitus tipo 2, definida por uma relativa deficiência na secreção de insulina e resistência à insulina, acomete 90% dos casos, que em sua grande maioria apresentam obesidade; e 3) Diabetes mellitus gestacional, que é definida como a tolerância diminuída aos carboidratos, diagnosticada a primeira vez no período gestacional, podendo ou não persistir após o parto; 4) Os outros tipos de diabetes tem sido elucidados atualmente, tais como defeitos genéticos da função da célula tipo beta, defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas, endocrinopatias, indução por drogas ou produtos químicos, infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediado (GROSS et al., 2002; CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017).

O diabetes está entre as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) que mais cresce no mundo, atualmente estima-se que 415 milhões de pessoas no mundo possuem diabetes mellitus e isso equivale a 8,8% da população. Estima-se ainda que para o ano 2040 esse número

possa chegar a 642 milhões. O Brasil ocupa a 4^a posição no ranque de países com o maior número de diabéticos, chegando a 14,3 milhões (IDF, 2015).

Em 2013, de acordo com o levantamento elaborado a partir dos dados do Sistema de Informação da Atenção Básica (SIAB) do Ministério da Saúde (MS), verificou-se que em Santa Catarina a estimativa de pacientes diabéticos foi de 134.585 casos. O gasto público com pacientes diabéticos no Brasil em 2015 foi de US\$ 22 bilhões, com projeção de US\$ 29 bilhões para 2040. Acredita-se que os gastos com saúde de indivíduos com diabetes são duas a três vezes maiores do que com aqueles sem diabetes (IDF, 2015).

O diabetes está associado com as maiores taxas de hospitalização e utilização dos serviços públicos, bem como maior incidência de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, cegueira, insuficiência renal e amputações de membros inferiores. Notadamente, um dos sintomas mais observados ultimamente é a dor neuropática, e observou-se também que sua prevalência se dá em pacientes pré-diabéticos. Estudos apontam que um aumento da incidência de hiperglicemia gera um possível aumento da morbidade e mortalidade (IDF, 2015; SCHESTATSKY, 2008; UAZMAN et al., 2014).

A dor é definida como experiência emocional e sensorial desagradável relacionada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termo de tal lesão. Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo melhor compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva que envolve as fibras sensoriais de pequeno diâmetro e o trato espinotalâmico (SCHESTATSKY, 2008; COHEN; MAO, 2014).

A neuropatia diabética é uma complicação crônica, sendo uma das complicações mais incapacitantes do diabetes, diminuindo a qualidade de vida. É também responsável pelo aumento das utilizações de serviços públicos e internações, além de ser a causa de dois terços de amputações não traumáticas. Estima-se que a prevalência da dor neuropática aumente devido a maior sobrevivência de pacientes com doenças crônicas. Entretanto, estudos recentes e dados da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) indicam que o controle metabólico adequado da diabetes pode reduzir de 40 a 60% a frequência e a intensidade das lesões neurológicas (IDF, 2015; SCHESTATSKY, 2008; CASELLINI; VINIK, 2006).

A dor se dá por meio da ativação de receptores sensoriais denominados de nociceptores, localizados em terminações nervosas das fibras aferentes primárias. A transdução de estímulos nocivos; sejam eles químicos, térmicos e ou mecânicos, em estímulos elétricos ocorre por meio de receptores ou canais iônicos específicos, como os canais de potenciais transitórios do tipo vaniloíde 1 (TRPV1). A condução do estímulo sensorial até a medula espinal se dá por meio de fibras aferentes não mielinizadas (fibras C) ou pouco mielinizadas (fibras A δ). A transmissão

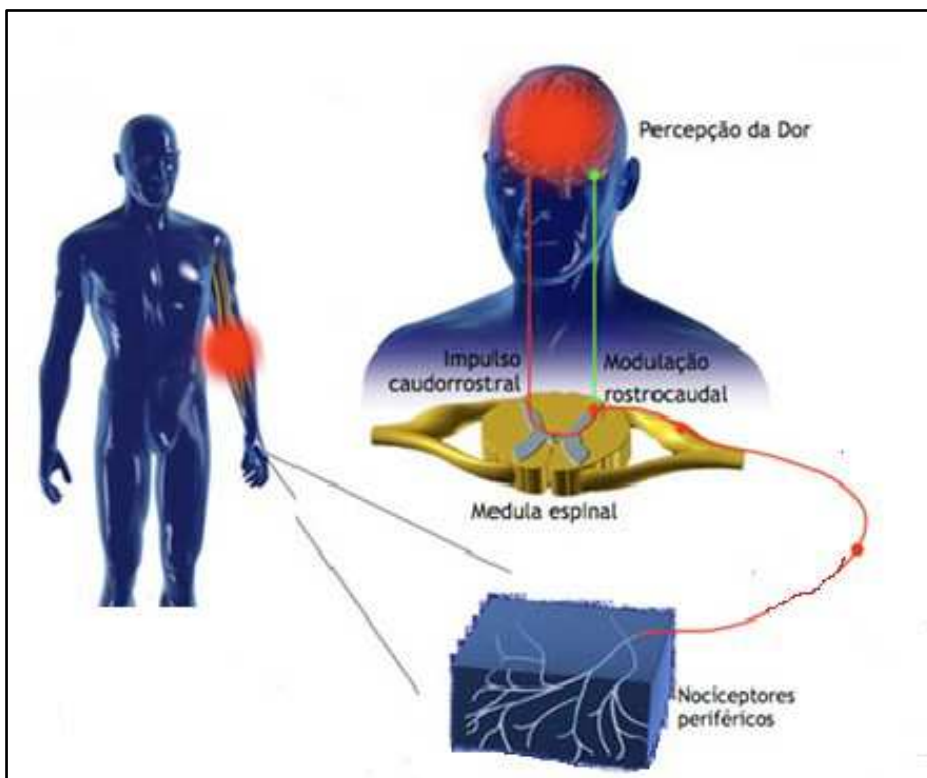
ocorre através de sinapses excitatórias mediadas pela ação de glutamato em receptores de N-metil D-aspartato (NMDA) e de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) e de cainato (KOIVIST et al., 2013; UAZMAN et al., 2014).

Um dos mecanismos mais aceitos para explicar a dor neuropática é a geração ectópica de impulsos nervosos nas fibras sensorial do tipo C e do tipo A δ . O disparo espontâneo das fibras nervosas após lesão se dá por uma expressão aumentada de canais de sódio em gânglios da raiz dorsal e ao redor do local da lesão no terminal de axônios lesados, conforme ilustra a figura 1.

As principais causas de dor neuropática são: diabetes mellitus, neuralgia pós-herpética, neuralgia trigeminal, síndrome dor complexa regional, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, lesão medular, entre outros (SCHESTATSKY, 2008).

Atualmente, existem no mercado poucos medicamentos para o tratamento de dor neuropática, sendo os antidepressivos e os anticonvulsivantes que agem em canais de cálcio as classes mais utilizadas. Entretanto, devido aos efeitos adversos e refratariedade desses medicamentos, o tratamento acaba se tornando ineficaz. Não obstante, o tratamento para dor neuropática que consiga 30% de diminuição da dor pode ser considerado um sucesso (SCHESTATSKY, 2008; COHEN; MAO, 2014).

Figura 1 - Processo de nocicepção



Fonte: Adaptado de Brandão (2014).

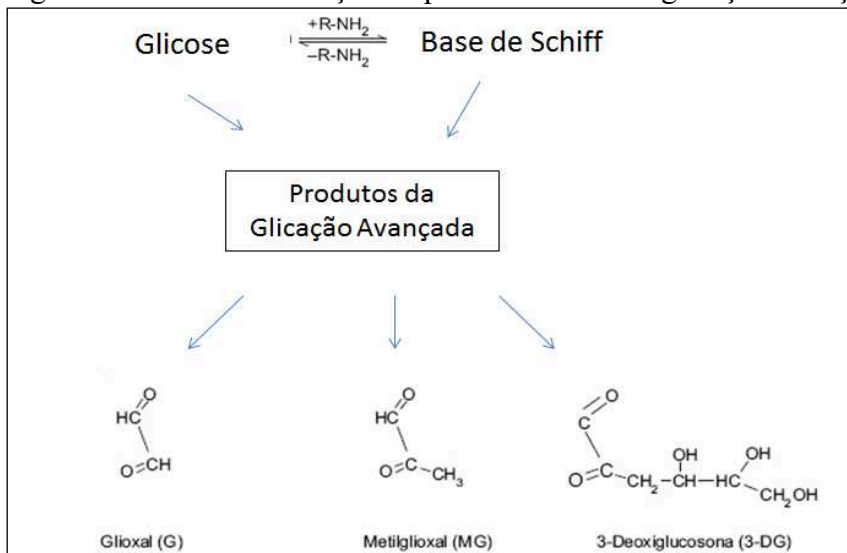
A maior incidência de dor neuropática é aquela causada pela diabetes. Ademais, observou-se uma alta prevalência deste sintoma nos pacientes com pré-diabetes (SBD, 2015).

Entre as teorias que explicam como a hiperglicemia crônica conduz as complicações observados nessa doença, a formação dos produtos finais de glicação avançada, também chamados AGEs (do inglês, *Advanced Glycated End-Products*), é considerada uma das mais importantes (PEPPA, 2003; GROENER et al., 2017; PICU et al., 2017; ANDERSSON et al., 2013; HUANG et al., 2015).

Os portadores de diabetes apresentam concentrações séricas de AGEs significativamente mais altas que os indivíduos não-diabéticos. A hemoglobina glicosilada (HbA)_{1c} é um importante marcador biomolecular, é o indicador mais confiável de progressão da doença (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). Existe um aumento da glicação da mielina nos diabéticos, os AGEs na mielina podem se ligar a proteínas plasmáticas e estimular reações imunes, que potencializem a desmielinização neuronal (SARTORI, 2010).

Ademais, acredita-se que os AGEs se formam, em primeiro lugar, a partir de reações não enzimáticas entre glicose e proteínas extracelulares. Porém, por causa da maior reatividade dos precursores dicarbonílicos derivados da glicose gerados intracelularmente (glioal, metilglioal (MG) e 3-deoxiglicosona), a alta concentração de glicose intracelular é considerada atualmente o evento iniciador primário da formação de AGEs intra e extracelulares (GROENER et al., 2017; PICU et al., 2017; ANDERSSON et al., 2013; HUANG et al., 2015). Os AGEs formados à partir de glioal, metilglioal (MG) e 3-deoxiglicosona, são muito mais reativos do que os açúcares do qual são derivados, agindo como propagadores da glicação (HANSON, 2015). Conforme mostra a figura 2.

Figura 2 - Rotas de formação de produtos finais da glicação avançada



Fonte: adaptada de Sartori (2010).

O MG é um composto dicarbonilo de fonte endógena e exógena (SARTORI, 2010; HANSON, 2015). Sendo este um composto capaz de permear a membrana plasmática das células por difusão passiva. Foi proposto que a meia vida do MG é aproximadamente 4 minutos, porém quando consideramos o metabolismo pela glioxalase seu tempo de meia vida aumenta para em média 10 minutos. A maior parte do MG livre (cerca de 95%) está ligada de forma reversível a proteínas plasmáticas, podendo ficar ligado a proteína no plasma por cerca de 3,6 h. A formação endógena do MG pela via glicolítica se dá com a eliminação do grupo fosfato por uma enzima isomerase, pode ainda ser gerado por outras vias como a gliconeogênese, podendo ainda ser produzido no espaço intracelular pelo metabolismo dos corpos cetônicos, através das enzimas do citocromo P₄₅₀ e mieloperoxidase, e o catabolismo do aminoácido treonina pela enzima amino oxidase, podendo também ser formado por meio não enzimático, pela lenta degradação de glicose e dos produtos de Amadori e pela reação de Maillard e a oxidação do acetol e a peroxidação lipídica (SARTORI, 2010; HANSON, 2015). A glicação ocorre de forma fisiológica, porém em algumas situações patológicas ela se torna exacerbada, o diabetes é um exemplo onde stress oxidativo e o aumento da concentração plasmática e tecidual de MG esta relacionada com o aparecimento da doença e de suas complicações (HANSON, 2015; ANDERSSON et al, 2013; SARTORI, 2010).

Andersson et al. (2013) também correlacionaram o estresse oxidativo, peroxidação lipídica, maior formação de AGEs e MG na hiperglicemia com a sensibilização de receptores de potencial transitório anquirina do tipo 1 (TRPA1). Tal observação indica que o aumento da formação de MG é suficiente para produzir neuropatia sensorial diabética dolorosa, estimulando seletivamente fibras nociceptivas. É provável que os níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica também contribuam para o desenvolvimento da neuropatia sensorial na diabetes. Contudo, as concentrações aumentadas de MG, em modelos animais de diabetes são importantes e se relacionam com os achados descritos para os pacientes diabéticos (BIERHAUS et al., 2012; ANDERSSON et al., 2013).

O achado, que o acúmulo anormal de MG pode causar danos a vários tecidos e órgãos e também induz apoptose de maneira dependente da dose em células beta pancreáticas de ratos fortalece a hipótese que o MG pode ser um mediador na indução a hiperglicemia (CHANG et al., 2016).

De acordo com Huang et al. (2015), ratos diabéticos que apresentam dor neuropática tem os níveis de MG aumentado comparado com os ratos que não relatam dor, que em condições normais pode variar de 0,5 a 1,5 $\mu\text{mol/L}$, reafirmando a associação da lesão de neurônios periféricos e a dor neuropática com o acúmulo de MG. Ademais, o MG promove

alterações químicas e elétricas que resultaram no aumento da excitabilidade elétrica e facilitação dos disparos de neurônios nociceptivos (HUANG et al., 2015).

A estrutura química do MG é semelhante à do formaldeído, um agonista de canais iônicos de potencial transitório anquirina do tipo 1 (TRPA1) e que também promove excitação de neurônios sensoriais primários. Tal observação fornece subsídios para a hipótese de que o MG também produza respostas nociceptivas semelhantes ao formaldeído, já que conforme os dados acima mencionados, o MG está aumentado em pacientes diabéticos que apresentam dor neuropática. Além disto, o estudo de Huang et al. (2015) ainda sugere que o MG possa ser um biomarcador sanguíneo de dor neuropática em pacientes diabéticos.

1.1.1 Terapias Medicamentosas

A Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico grave que envolve o sistema endócrino e segundo as estimativas, uma pessoa é detectada com diabetes a cada 5 s, enquanto alguém morre a cada 10 s por complicações causadas pela mesma. Agentes convencionais estão sendo usados para controlar a diabetes, juntamente com a mudança no estilo de vida. O tratamento em si é determinado pela etiopatologia da doença, subdividido em diabetes tipo I e diabetes tipo II, gestacional e outros (OSABEDE et al., 2014; UAZMAN et al., 2014).

A principal terapêutica utilizada para o controle da diabetes atualmente é o medicamento. Porém apesar de toda tecnologia desenvolvida incluindo os agentes hipoglicemiantes, recentemente aprovados, todos os medicamentos estão associados a vários efeitos adversos. Sabendo que a hiperglicemia é o resultado da destruição ou diminuição das células produtoras de insulina, e por isso ainda não há uma forma eficaz para o tratamento da doença, o que resulta na busca contínua de agentes antidiabéticos pelos cientistas (SARTORI; BECHARA, 2010).

As diferentes classes de medicamentos hipoglicemiantes foram desenvolvidas com intuito de coadjuvar uma com a outra para um melhor controle glicêmico.

O primeiro tratamento para diabetes foi a insulina, que é considerada até hoje um dos maiores feitos da medicina. Foi aplicada pela primeira vez no ano de 1922 em Leonard Thompson, que tinha 13 anos. Os jornais da época saudaram o que seria a cura da diabetes. Surgiu então um novo problema que era como viabilizar essa insulina para os pacientes diabéticos e logo começou-se a extração insulina do pâncreas de bovinos e suínos (SBD, 2019; SBEM, 2014).

Atualmente, existem quatro tipos de insulina para o tratamento da diabetes, que se diferem pelas técnicas de produção do DNA recombinante, sequência de aminoácidos, concentração, solubilidade e tempo de duração e tempo de duração biológica. As insulinas injetáveis apresentam: 1) Ação rápida, com início rápido e duração curta; 2) Ação curta, com início rápido; de ação intermediária; 3) Ação lenta com início lento (SBDE, 2019; SBD, 2019).

A insulina regular é estruturalmente idêntica à humana, já a insulina humana recombinante (NPH) é associada a duas substâncias que promovem um efeito mais longo. Temos ainda inúmeros análogos da insulina humana no mercado, sendo a insulina lispro a primeira a ser lançada, em 1996, considerada uma insulina ultrarrápida. Nessa mesma linha encontramos a insulina asparte e a insulina glulisina. Nas insulinas de ação prolongada, temos a insulina glargina (lançada em 2001 nos EUA) sendo que todas visam tratar o paciente com diabetes (SBDE; 2019; SBD, 2019).

Para um melhor controle metabólico foram desenvolvidos os medicamentos de uso oral e em 1955 foi lançada a primeira sulfonilúrea glibenclamida que atua aumentando a secreção pancreática de insulina, tendo início rápido, de curta duração, porém podem causar hipoglicemia. Atualmente, existe um grupo de derivados sulfonilureia, no qual incluem-se a gliclazida, a glipirida e a gliquidona e glimepirida (SBD, 2019; CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017).

Uma das principais drogas utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2 pertence a classe das biguanidas, que atuam diminuindo a resistência, principalmente hepática, à ação insulínica. Em 1960 a metformina foi obtida a partir de *Galegine officinalis*, utilizada até hoje como primeira escolha para o tratamento de diabetes tipo 2, pois ela apresenta uma redução de 29% das complicações microvasculares e 32% dos desfechos combinados do diabetes, não apresenta ganho de peso, não provoca hipoglicemia, é um medicamento seguro a longo prazo. Contudo, a monoterapia não é suficiente para um controle glicêmico, sendo necessário a utilização de outras classes de hipoglicemiantes (SIMÕES, 2003; CARVALHO, 2005).

Em 1980 surgiu a acarbose, um inibidor da alfa-glicosidase, droga que retarda a absorção de carboidratos, que embora tenha apresentado resultados favoráveis, não é das drogas mais prescritas devido a seus efeitos colaterais digestivos. Logo em seguida, na década de 1990, surgiram as tiazolidinedionas, drogas sensibilizadoras da ação insulínica, principalmente no músculo esquelético. A pioglitazona é a mais nova e a remanescente deste grupo (SBEM, 2014).

Na primeira década do século XXI surgiram os inibidores da dipeptidilpeptidase 4 (DPP-4), as gliptinas, hoje com vários representantes no mercado (vildagliptina, sitagliptina, saxagliptina, linagliptina). Essas drogas atuam aumentando o efeito do GLP-1, que é um

peptídio semelhante ao glucagon 1, uma incretina derivada do produto da transcrição do gene de pró-glucagon, as células enteroendócrinas do íleo secretam o GLP-1 como um hormônio do trato gastrointestinal, seu efeito se dá por bloquear a degradação desse hormônio, elevando seus níveis circulantes, tendo assim efeitos diretos na estimulação de insulina, supressão de glucagon, desacelerando o esvaziamento gástrico, melhorando a sensibilidade a insulina e reduzindo o consumo de alimentos (SBEM, 2014; CHARA, 2006; SBD, 2019).

Como, o GLP-1 apresenta uma meia vida curta, além dos inibidores do DPP-4, estudos foram realizados visando o desenvolvimento de agonistas do receptor de GLP-1 e de análogos do GLP-1. Entretanto, essas drogas têm a necessidade de serem injetáveis. Hoje temos nesse grupo a exenatida e a liraglutida (SBD, 2019; SBEM, 2014).

1.1.2 Terapias alternativas para controle da glicemia

Antes do descobrimento dos medicamentos para o tratamento da diabetes, as terapias utilizadas eram a dieta e o uso de plantas medicinais.

Acredita-se que o uso de recursos vegetais para fins medicinais, surgiu com as primeiras sociedades humanas tradicionais. Seu aprendizado se estruturou por meio de observações sistemáticas e de experimentações, passando de geração a geração através da oralidade, estando intimamente ligada a necessidade dos povos e para a sobrevivência e sustentabilidade dos grupos. A cultura para o uso de plantas medicinais no Brasil vem dos índios brasileiros e do povo que colonizou o país (SIMÕES, 2003; SILVEIRA et al., 2009; VASQUEZ, 2014).

O uso de plantas com propriedades farmacológicas tem sido utilizado para tratamento, cura e prevenção de doenças em todo o mundo. O aumento da utilização de plantas justifica-se em grande parte pela boa aceitação social e à crença (SALGADO, 2009; TELES, 2013).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Porém, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos (SIMÕES, 2003).

A natureza proporcionou à humanidade uma grande variedade de medicamentos para o tratamento de várias doenças. Alguns agentes antidiabéticos foram desenvolvidos a partir de fontes naturais, como por exemplo, o desenvolvimento de metformina, uma das principais drogas utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2, que é derivada das guanidinas que foram obtidas de *Galegine officinalis*. Porém ainda pouco se investe no desenvolvimento de fármacos

a partir das mesmas, apesar de as plantas medicinais brasileiras serem consideradas promissoras (SIMÕES, 2003).

O Formulário Brasileira contém monografias sobre tinturas e seu modo de preparação e proporção de plantas no extrato. De acordo com o regulamento brasileiro, as plantas medicinais devem ser padronizadas para serem inseridas no sistema básico de saúde ou no desenvolvimento de fitoterápicos (BARBOSA et al., 2013).

Em 1990, a Lei nº 8.080 instituiu que *o dever do Estado de garantir a saúde consiste na formulação e execução de políticas econômicas e sociais que visem à redução de riscos de doenças e de outros agravos e no estabelecimento de condições que assegurem acesso universal e igualitário às ações e aos serviços para a sua promoção, proteção e recuperação*. No campo de atuação do SUS, a formulação de política de medicamentos teve como propósito *garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, a promoção do uso racional e o acesso da população àqueles considerados essenciais* (política programa nacional plantas medicinais fitoterápicos).

A implantação da fitoterapia nos serviços públicos de saúde no Brasil começou a partir da década de 1980. Em 1981 iniciou-se a priorização do estudo de plantas medicinais de investigação clínica, e em 1982 a implantação do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, esse programa foi desenvolvido com o intuito de fornecer alternativas terapêuticas e complementares, com embasamento científico, com medicamentos fitoterápicos originados a partir da determinação farmacológica das preparações de uso popular, à base de plantas medicinais, com vistas à sua inclusão na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) (política programa nacional plantas medicinais fitoterápicos)

A publicação da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 17 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em fevereiro de 2000, normalizou o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária, garantindo a qualidade, a eficácia e a segurança destes fármacos (BRASIL, 2007).

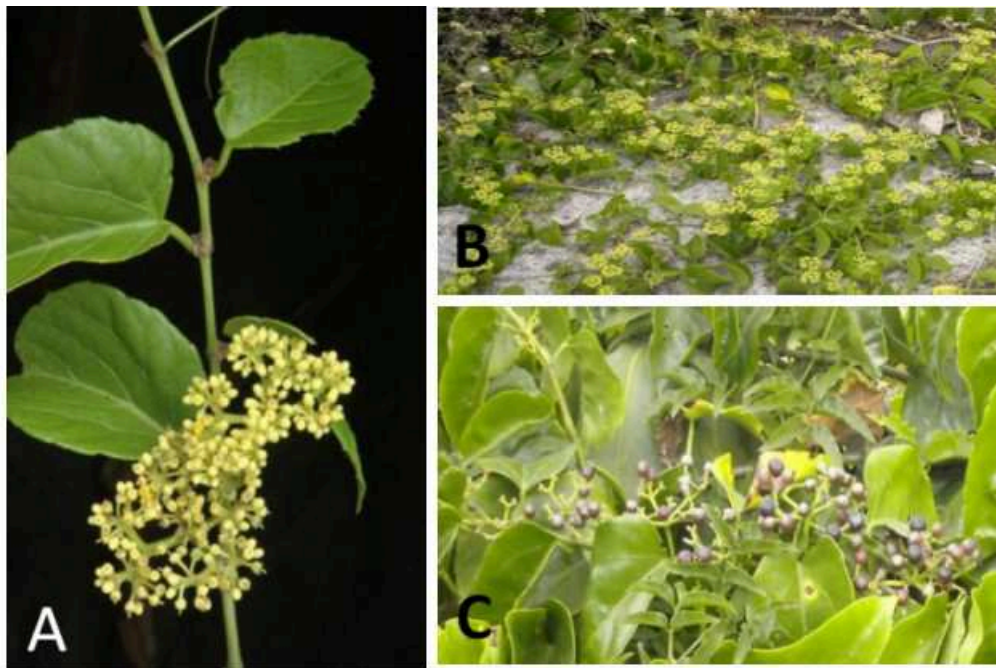
Em maio de 2006, o MS, por meio da Portaria nº 971, aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), incluindo a fitoterapia. Ainda em 2006, foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que incentiva a pesquisa e estimulam a adesão da fitoterapia nos programas de saúde pública, garantindo que a população tenha acesso ao uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicas (BRASIL, 2006a). Com o fortalecimento destas práticas na atenção básica, observou-se a necessidade de estudos dos profissionais da saúde sobre essa terapêutica e intenção de uso (CACCIA-BAVA et al., 2017).

O Brasil possui grande potencial no desenvolvimento desta terapêutica, e vale ressaltar o uso consagrado pela população brasileira do chá das folhas da insulina vegetal (*Cissus verticillata*) como coadjuvante em tratamentos de diabetes (BRAGA et al., 2007). Assim, a hipótese deste estudo é que o uso do extrato aquoso de *Cissus verticillata* pode promover o alívio da dor associada à diabetes e, desta forma, tornar-se num tratamento coadjuvante para evitar ou retardar o aparecimento das complicações decorrentes da hiperglicemia, especialmente da dor neuropática.

1.2 CISSUS

A planta *Cissus verticillata* (Figura 3) sinônima de *C. sicyoides*, pertence à família Vitaceae, é popularmente conhecida no Brasil como cipó-pucá, aniltrepador, cortina, uva brava, insulina vegetal, puçá, e tinta dos gentios (LINO et al., 2008; BELTRAME et al., 2001; PEPATO et al., 2003).

Figura 3 - *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis.



A, folhas e inflorescência; B, visão da planta com folhas e inflorescência no solo; C, frutos.
Fonte: Alipi e Pichardo (2007).

Ela é utilizada popularmente para tratamento de diabetes tipo 2, por ter ação hipoglicemiante. Recomenda-se o uso na forma de chá das folhas, pelo método de decocção ou infusão. A literatura científica descreve ainda o efeito como anticonvulsivante, anti-

inflamatória, antirreumática, antitérmica, anti-hipertensivo (OLIVEIRA et al., 2012; DROBNIK; OLIVEIRA, 2015; SALGADO, 2009; LINO et al., 2008; PEPATO et al., 2003), antigripal, contra infecções respiratórias (GARCIA et al., 1999), dislipidemia, problemas urinários (LANS, 2006) e indigestão.

No México essa planta é usada pela população na forma de infusão para o tratamento de dor e de inflamação (BELTRAME et al., 2002).

1.2.1 Descrição botânica

De acordo com Braga (2008), a classificação taxonômica de *Cissus verticillata* é:

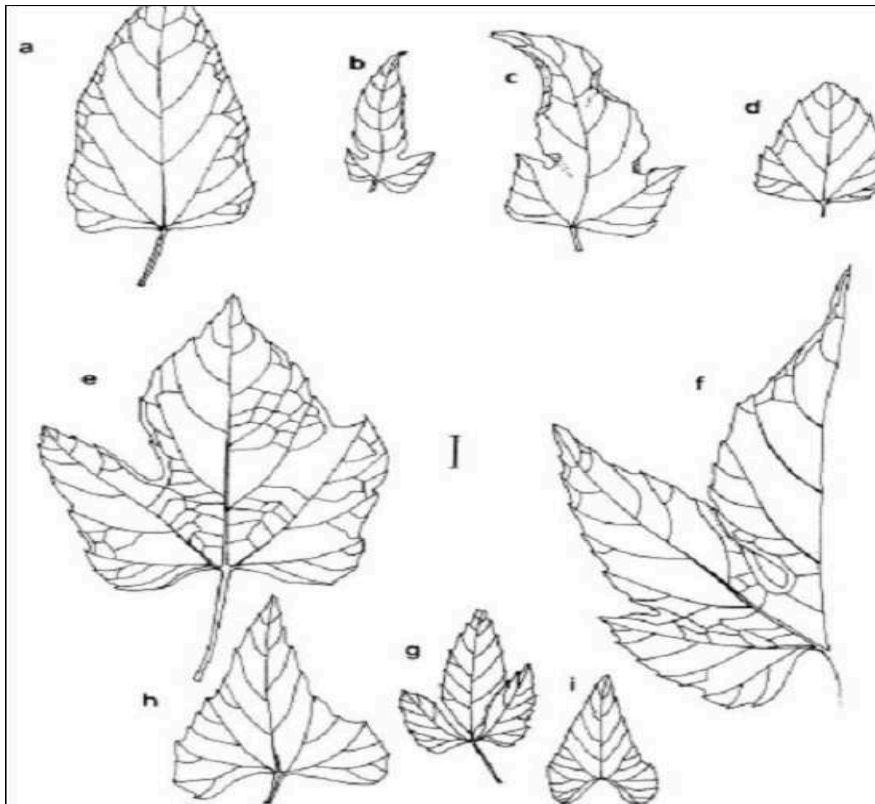
- Reino: Planta;
- Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);
- Superdivisão: Spermatophyta (plantas com sementes);
- Divisão: Magnoliophyta (plantas com flor);
- Classe: Magnoliopsida (dicotiledôneas);
- Subclasse: Rosida;
- Ordem: Rhamnales. Incluem-se nesta ordem apenas 3 famílias: Rhamnaceae, Vitaceae e Leaceae.
- Família: Vitaceae.

Esta espécie pertence à família Vitaceae, é uma das mais de 350 a 400 espécies de trepadeiras, distribuída pela América Central e Sul, é uma videira que cresce espontaneamente em várias regiões do Brasil. É encontrada geralmente em ambientes ensolarados e próximos aos cursos de água, tem hábito herbáceo, trepador, perene, com gavinhas opostas às folhas. No Brasil essa família é representada apenas pelo gênero *Cissus* com 42 espécies (SILVA et al., 2017; PEPATO et al., 2003).

Caracteres anatômicos podem ser usados na identificação da planta visando contribuir para o seu controle de qualidade. É uma videira com hastes herbáceas e lenhosas, encontrada como trepadeira (com até 10 metros) ou arbusto perene (com até 3 metros). O tronco ocasionalmente produz raízes aéreas pendulares. Tem caule flexível, às vezes com pelos (caules jovens), no ponto onde nasce cada folha, ocorre um par de estípulas. O sistema radicular com raízes primárias, secundárias e terciárias, raiz cilíndrica, amarelo pálido a marrom, de odor agradável e sabor discreto (ALIPI; PICHARDO, 2007; BRAGA, 2008).

As folhas são alternadas, simples ou compostas de formas variáveis (ovaladas, ovaladas-elípticas ou oblongas), lobadas ou profundamente partidas, podendo atingir 15 cm de comprimento por 12,5 cm de largura, pontiagudas, de base variável (redonda, cordada, sagitada), às vezes coberta de pelos e margens denteadas (Figura 4) (ALIPI; PICHARDO, 2007; BRAGA, 2008).

Figura 4 - Variação das folhas de *Cissus verticillata*.



Fonte: Braga (2008).

A inflorescência é quase sempre oposta às folhas, axilares ou extra-axilares, pedúnculos 3, 5-5, 2 cm, com flores pequenas de coloração verde-amareladas, branco-esverdeadas, brancas, amarelas ou raramente rosas, em forma de copo (Figura 5G) (BRAGA, 2008).

Figura 5 - *Cissus verticillata* (L.)



A, hastes com inflorescências jovens e com caule jovem com gavinhas; B, vista dorsal do mesmo tronco; C, região entre o caule e a raiz; D, caule mais velho; E, Raiz com casca parcialmente retirada; F, sistema radicular inteiro; G, Inflorescências; H, botões de flores e uma flor; J, frutos maduros. Barra de Escalas: A - 3 cm; B, E, G, H - 2 cm; C, D, J - 1 cm; F- 4 cm.

Fonte: Oliveira (2012).

Os frutos são tipo baga lateralmente arredondadas, medindo em média 1×1 cm, textura lisa e de cor púrpura a negra, semente subturbina. Os frutos de *C. verticillata* podem ser consumidos, apesar de insípidos (Figura 5J) (ALIPI; PICHARDO, 2007).

No rosto das folhas do *C. verticillata* são encontradas estruturas secretoras chamadas de glândulas de pérola ou corpos de pérolas. Estudos recentes evidenciaram essas estruturas como corpos alimentares, com base nas características morfológicas e funcionais. As células que compreendem estas glândulas são ricas em proteínas, óleos e açúcares.

Outra estrutura encontrada na *C. verticillata* e que é comum na família Vitaceae, são os idioblastos cristalíferos. Funções diferentes são atribuídas a essas substâncias como: defesa mecânica de herbívoros, suporte estrutural, reserva de cálcio, manutenção do equilíbrio iônico e metal e desintoxicação do ácido oxálico. Nas espécies de *Leea angulata*, *Vitis vinifera*, *Cissus verticillata* foram detectados idioblastos secretores com conteúdo de polissacarídeos e os compostos fenólicos distribuídos no tecido do parênquima do caule, provavelmente encontrado também em outras espécies de Vitaceae. As células secretoras podem sintetizar várias substâncias, como taninos, cristais, mucilagem, óleos essenciais e resinas, entre outros, que

pode estar associado ao mecanismo de defesa química da planta (BARBOSA et al., 2013; OLIVEIRA, 2012).

1.2.2 Componentes Químicos

De acordo com a literatura, os dados fitoquímicos mostraram que folhas de *Cissus verticillata* contêm: taninos, esteroides e triterpenos, aminoácidos, cetoesteroides, carotenoides, vitamina E, alcaloides, canferol, compostos graxos e flavonoides, mais especificamente, kaempferol, luteolina e luteolina-3'-sulfato e quercetina, todos relacionados à atividade biológica da planta (OLIVEIRA, 2012; BRAGA et al., 2007).

Salgado (2009) mostrou a existência de alguns outros compostos tais como: taninos, saponinas e cumarinas. Recentemente a tiramina também foi isolada da planta. Estudos mostraram que a administração de tiramina a ratos diabéticos promovem um aumento da eliminação de glicose.

1.2.3 Atividade Farmacológica da *Cissus verticillata*

Os estudos de Garcia et al. (2000) evidenciaram o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso de folhas de *Cissus sicyoides*. O efeito anti-inflamatórios foi investigado em dois modelos experimentais *in vivo*. O edema de pata de rato induzido por carragenina, e o teste de edema de orelha de camundongos usando acetato de tetradecanoilforbol como agente inflamatório como modelo de inflamação tópica.

Por outro lado, Viana et al. (2004), demonstraram que o chá obtido de folhas de *C. sicyoides* foi efetivo em reduzir de forma significativa a concentração de glicose, triglicerídeos e transaminases no sangue de ratos com Diabetes mellitus do tipo 2. Em adição, os autores sugerem que os polissacarídeos são os compostos responsáveis pela redução da glicose, enquanto os flavonoides são responsáveis pela diminuição da concentração de triglicerídeos e de transaminases, justificando o uso desta espécie como alternativa no tratamento desta doença.

Não obstante, Pepato et al. (2003), também mostraram que chá das folhas de *Cissus sicyoides* obtido por decoção promoveu redução significativa da concentração de glicose no sangue e na urina, bem como reduziu a concentração de uréia na urina de ratos tratados com o chá das folhas de *Cissus sicyoides*.

Estes achados fornecem subsídios científicos e claramente contribuem para o aumento das pesquisas sobre a *Cissus verticillata*.

Os compostos fenólicos e óleo essencial são usados na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças. A população usa chá feito das partes vegetativas desta espécie para tratar: doenças inflamatórias no geral, febres, reumatismo e diabetes (BARBOSA et al., 2013).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil fitoquímico e o efeito antinociceptivo (analgésico) do extrato aquoso da folha de *Cissus verticillata* em camundongos.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil fitoquímico do extrato das folhas de *Cissus verticillata*;
- Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato aquoso da folha de *Cissus verticillata* na nocicepção relacionada à diabetes;
- Verificar o envolvimento de receptores de potenciais transitórios (TRPs) o tipo vaniloíde 1 (TRPV1) e anquirina 1 (TRPA1) no efeito antinociceptivo do extrato.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

2.1.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Cissus verticillata* utilizadas no estudo foram coletadas no bairro Coloninha, na cidade de Araranguá, Santa Catarina, no dia 23 do mês de fevereiro de 2018, no período da manhã. Confeccionou-se exsicata que foi identificada pela Dr. Vanilde Citadini Zanette, da – Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e depositada no Herbário da UNESC sob o número CRI 13298 (Figura 6).

Figura 6 - Amostra de exsicata *Cissus verticillata*



Fonte: Autora (2019).

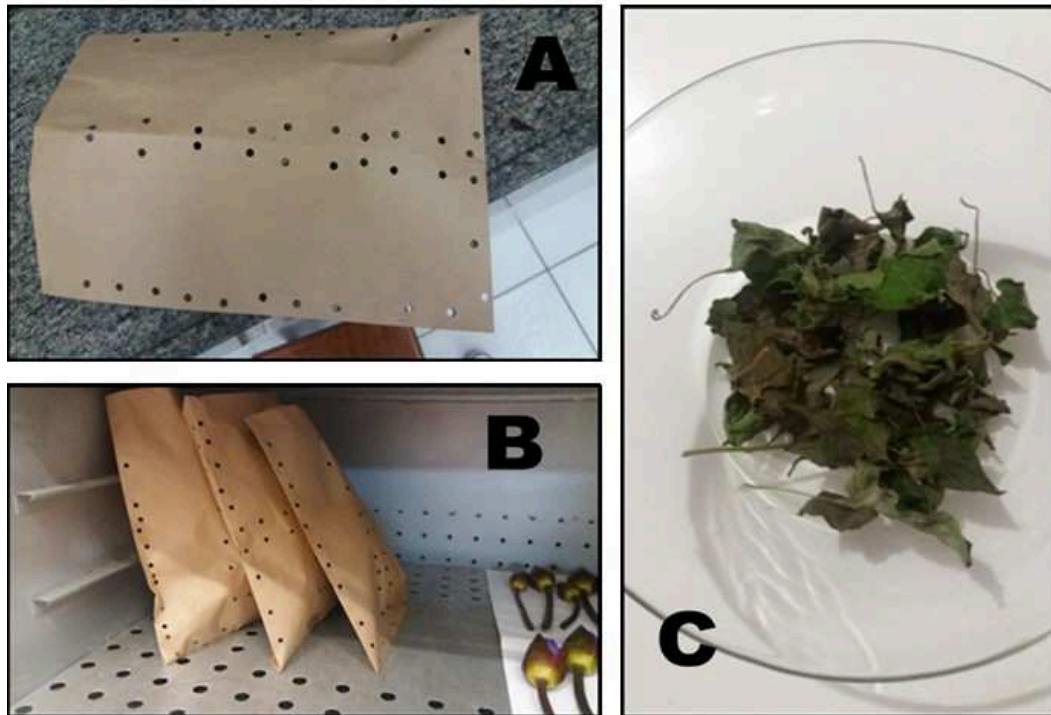
2.1.2 Processos de secagem

Após a identificação da *Cissus verticillata* procedeu-se uma nova coleta das suas folhas no dia 25 de março de 2018 para a preparação do extrato aquoso. Para tal, as folhas (500 g) foram selecionadas e retiradas do talo e colocadas em envelopes perfurados (Figura 7 A) dentro de uma estufa de ar circulante com temperatura de 45 a 50 graus (Figura 7 B). As folhas foram mantidas na estufa por um período de 96 h e para um melhor processo de secagem permaneceram por mais 96 h em repouso dentro da estufa. Decorrido o processo de secagem,

obteve-se 100 g das folhas secas, indicando que elas continham uma quantidade significativa (80%) de água (Figura 7C).

No dia 24 de maio de 2018 foram coletadas 49,1 g de folhas frescas da planta as quais foram selecionadas e retiradas do talo para posterior determinação do teor de umidade.

Figura 7 – Processo de secagem das folhas de *Cissus verticillata*



A: envelope utilizado para secagem; B: envelope contendo as folhas na estufa de secagem; C: visão das folhas após o processo de secagem.

Fonte: Autora (2019).

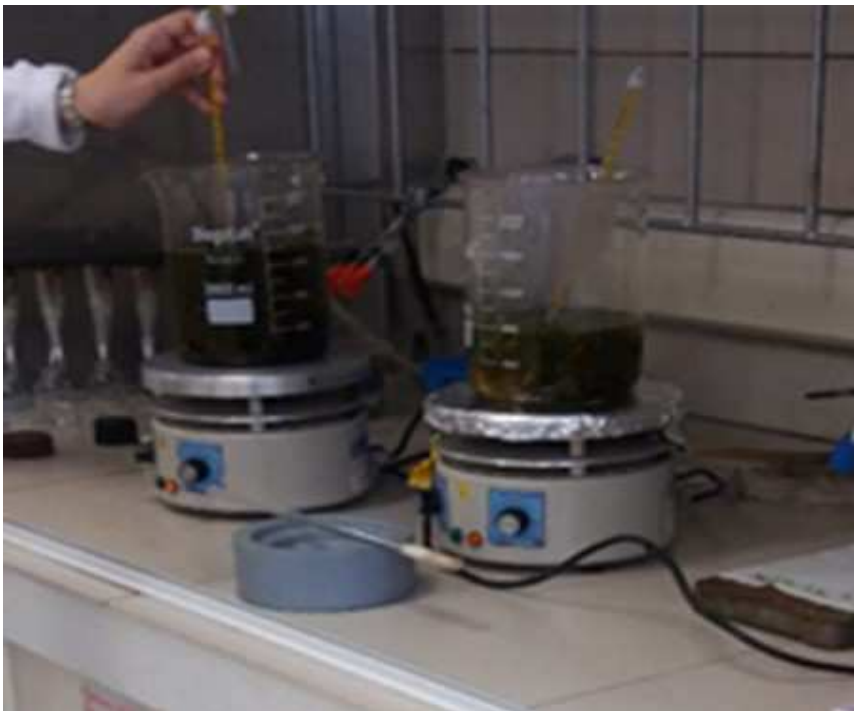
2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *CISSUS VERTICILLATA*

O material vegetal fresco ou seco teve seu teor de umidade estabelecido. Para tal, o material vegetal (exatamente 0,5 g) foi avaliado, em triplicata, no analisador de umidade por infravermelho Ohaus® modelo MB45, cujos parâmetros incluíram a temperatura de determinação de 105 °C e peso constante identificado com a variação de peso menor que 1 mg durante 60 s.

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *CISSUS VERTICILLATA*

O extrato aquoso de *Cissus verticillata* foi preparado por meio da técnica de decoção na proporção de 1:15 (proporção droga vegetal: líquido extrator). As folhas secas (84,3 g) ou frescas (49 g) triturada manualmente (foram colocadas separadamente com 1,25 e 0,7 L de água, respectivamente, em Becker com capacidade de 2 L sob uma placa de aquecimento até alcançar a temperatura de 100°C). Após atingir a temperatura desejada de 100° C, o material botânico foi mantido em aquecimento por mais 15 min para obtenção do extrato aquoso das folhas secas ou frescas (Figura 8). Ao final do período de aquecimento, o extrato aquoso obtido foi filtrado com papel filtro em um funil de vidro e armazenado em frascos âmbar e mantido em geladeira até o uso.

Figura 8 – Preparação do extrato aquoso das folhas de *Cissus verticillata*.



Fonte: Autora (2019).

2.4 LIOFILIZAÇÃO

O extrato aquoso obtido das folhas secas e frescas de *Cissus verticillata* foi liofilizados para a máxima extração de água e obtenção do extrato seco.

A liofilização é uma técnica de secagem que constitui na remoção de água através da sublimação. É um processo onde a substância é congelada e então a quantidade de solvente é reduzida, primeiro por sublimação e posteriormente por dessorção. É um processo que possibilita a passagem da água de seu estado sólido direto para o gasoso, sobre condições especiais de pressão e temperatura. O desempenho da liofilização depende do processo de congelamento. O produto deve ser congelado por exposição a temperaturas inferiores ao seu ponto de congelamento. O processo de liofilização se mostra eficiente comparado com outros meios de desidratação (LIOFILIZAÇÃO, 2013).

2.5 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Nesta etapa do estudo, optou-se por realizar a análise fitoquímica do extrato obtido a partir das folhas secas de *Cissus verticillata*; tal escolha ocorreu, em virtude do seu maior rendimento em relação ao extrato obtido das folhas frescas.

2.5.1 Análise qualitativa do extrato por UPLC-HRMS

O perfil fitoquímico do extrato obtido a partir das folhas secas de *C. verticillata* foi efetuada em sistema UPLC *Acquity* equipado com detector de arranjo de diodos (PDA), amostrador automático, sistema quaternário de solventes e uma coluna cromatográfica *Acquity BEH C18* (50 x 1,0 mm e 1,7 μ m) (Waters), da Central de Cromatografia, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da (UFSC).

A coluna cromatográfica foi mantida a 40 °C, enquanto a bandeja com a amostra permaneceu a temperatura de 20 °C.

O sistema UPLC estava acoplado ao Espectrômetro de Massas MS/MS *Xevo G2-S QToF* (Waters) com ionização por electrospray (ESI) operando no modo positivo (ESI+). Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo, com a faixa de massa entre 100-1200 Da e um tempo de varredura de 0,3 seg. Os parâmetros do sistema foram: fluxo do gás do cone 200 L/h; fluxo do gás de dessolvatação 900 L/h; voltagem no cone 20-30 V; voltagem na fonte 80 V. O argônio foi utilizado como gás de colisão e o nitrogênio como gás de nebulização, dessolvatação e de cone. MS e MS2 foram adquiridos no modo centro e corrigido durante a aquisição de uma referência externa (*LockSpray*TM) com uma constante de infusão de solução de Leucina-encefalina (1 ng/mL) a uma taxa de fluxo de 20 μ L/min, para garantir valores precisos de massa foi utilizada como padrão de referência.

O extrato foi solubilizado em água, na concentração de 1,0 mg/mL e filtrados em membrana filtrante de micropore com poro de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm (Tedia Company, Inc., EUA) e armazenada a 4°C antes da análise.

Os dados foram processados e armazenados utilizando-se o software MassLynx™ V4.1 Mass Spectrometry (Waters, USA).

2.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA (ANALGÉSICA)

2.6.1 Animais

Foram utilizados 123 camundongos (80 fêmeas e 43 machos) Suíços, com aproximadamente dois meses de idade, peso entre 25 a 35 g, provenientes do Biotério Central da UFSC localizado no Campus Reitor João David Ferreira Lima, Florianópolis, SC. Após serem recebidos, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI), Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB, em microisoladores (ALESCO) contendo no máximo 6 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (60% -80%) em ciclos de 12 horas claro-escuro (6 às 18 horas), além de livre acesso a água e ração.

Para a realização dos estudos comportamentais, os camundongos foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para ambientação por pelo menos 1 hora antes da execução dos experimentos. Todos os procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob protocolo nº PP00745 e conduzidos de acordo com as normas de cuidados com animais de laboratório e diretrizes éticas para investigação de dor em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983).

Ressalta-se que todos os procedimentos foram executados de maneira a preservar ao máximo a integridade física dos animais, tendo como princípio reduzir ao máximo o sofrimento eventualmente causado, porém, necessário para a demonstração do efeito do tratamento proposto.

2.6.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de metilglioxal

Para verificar o efeito antinociceptivo (analgésico) do extrato aquoso das folhas secas de *Cissus verticillata* (EACv) sobre a nocicepção relacionado a diabetes, utilizou-se o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de metilglioxal. Brevemente, os animais

receberam 20 μ l de metilglioxal (300 μ g/pata) na região ventral da pata posterior direita conforme descrito anteriormente com pequena modificação (GRIGGS et al., 2017). Após a injeção de metilglioxal os animais foram colocados, individualmente, em uma caixa de acrílico, ao lado de um espelho para facilitar a observação (Figura 9). O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com metilglioxal foi cronometrado, durante 20 minutos, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com o EACv nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, por via intragástrica uma hora antes da realização dos experimentos. O grupo controle foi tratado com solução de salina (10 ml/kg, i.g.).

2.6.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

Para verificar o possível envolvimento do canal TRPV1 no efeito antinociceptivo (analgésico) do EACv, foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (agonista de receptor TRPV1). Brevemente, os animais foram injetados com 20 μ l de capsaicina (5,2 nmol/pata) na região ventral da pata posterior direita. Após a injeção de capsaicina os animais foram colocados, individualmente, em caixa de acrílico ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina durante 5 min foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção (SANTOS; CALIXTO, 1997). Os animais foram tratados com o EACv na dose não efetiva (30 mg/kg, i.g.) ou efetiva (300 mg/kg) na nocicepção induzida pelo metilglioxal, por via intragástrica uma hora antes da realização dos experimentos. O grupo controle foi tratado com solução de salina (10 ml/kg, i.g.).

2.6.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído

Para verificar o possível envolvimento do canal TRPA1 no efeito antinociceptivo (analgésico) do extrato, foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (agonista de receptor TRPA1). Para tal, os animais foram injetados com 20 μ l de cinamaldeído (10 nmol/pata) na região ventral da pata posterior direita. Após a injeção de cinamaldeído os animais foram colocados, individualmente, em uma caixa de acrílico, ao lado de um espelho para facilitar a observação. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com cinamaldeído durante 5 min foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção (CÓRDOVA et al., 2011). Os animais foram

tratados com o EACv na dose não efetiva (30 mg/kg, i.g.) ou efetiva (300 mg/kg) na nocicepção induzida pelo metilglioxal, por via intragástrica uma hora antes da realização dos experimentos. O grupo controle foi tratado com solução de salina (10 ml/kg, i.g.).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados no programa Graph Pad Prism versão 6.01 (2012, San Diego, CA, USA). Os dados foram analisados para avaliação de normalidade utilizando o teste de *Shapiro – Wilk* ($p > 0,05$). Desta forma, os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para comparação entre os grupos, foi utilizada ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey ou teste *t* de Student quando apropriado. Valores de *p* menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

3 RESULTADOS

3.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS FOLHAS SECAS E FRESCAS DE *CISSUS VERTICILLATA*

A tabela 1 apresenta os dados da determinação do teor de umidade das folhas secas e frescas, realizado em triplica. Pode-se observar que o teor de umidade foi significativamente maior nas folhas frescas ($t_{(df: 4)} = 254,2, p < 0,0001$) em relação as folhas secas de *C. verticillata*.

Tabela 1 - Teor de umidade da folha fresca e seca de *C. verticillata*

Amostras	Teor de umidade (%)	
	Folha Fresca	Folha Seca
1	81,22	11,97
2	82,04	11,49
3	81,58	11,70
Média ± E.P.M.	81,75 ± 0,62^a	11,72 ± 0,24

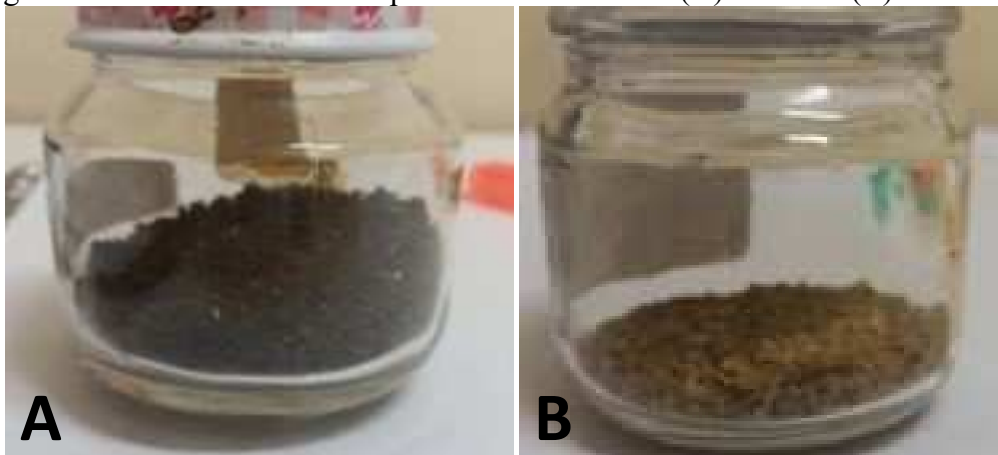
ap < 0,0001 analisado pelo teste t

Fonte: Autora (2019).

3.2 LIOFILIZAÇÃO

Após o processo de liofilização, o rendimento do extrato obtido a partir das folhas secas foi de 57,54%, ou seja, de 84,3 g de folhas secas obteve-se 48,51g de extrato (Figura 10 A). No entanto, o rendimento do extrato obtido a partir das folhas frescas foi 9,3 vezes menor em relação ao extrato obtido das folhas secas. O rendimento do extrato das folhas frescas foi de 6,16%, ou seja, de 49 g de folhas frescas obteve-se 3,02 g de extrato (Figura 10B).

Figura 9 - Extrato seco obtido a partir das folhas secas (A) e frescas (B) de *Cissus verticillata*



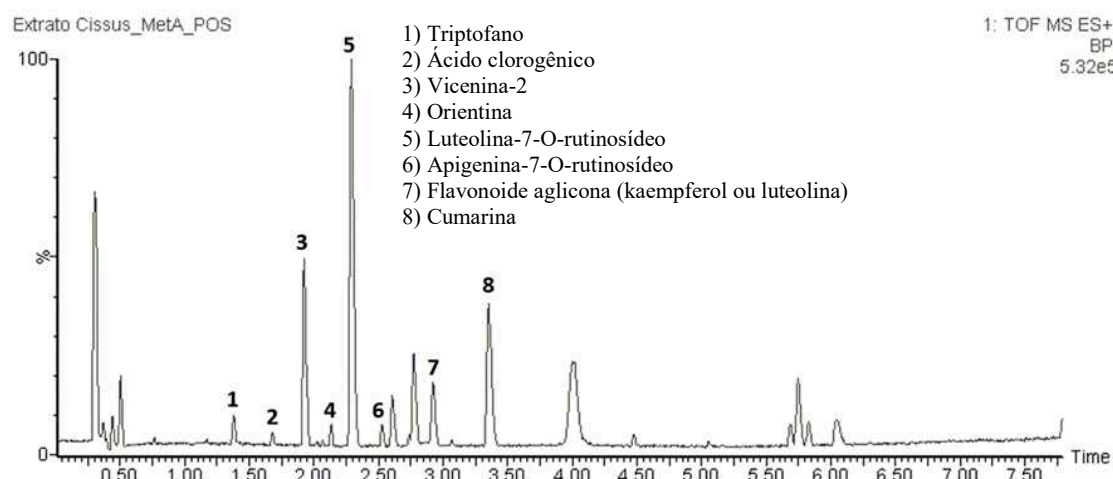
Fonte: Autora (2019).

3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA

3.3.1 Composição química do extrato aquoso obtido a partir das folhas secas de *C. verticillata*

O extrato das folhas secas de *Cissus verticillata* foi sensível à análise do modo de ionização positivo, pois o modo negativo apresentou o mesmo perfil cromatográfico e oito compostos foram detectados e as estruturas de nove foram relacionadas como segue: triptofano, ácido clorogênico, vicenina-2, orientina, luteolina-7-O-rutinosídeo e apigenina-7-O-rutinosídeo, a aglicona correspondente a kaempferol ou luteolina, cumarina. A Figura 11 e a Tabela 2 mostram a composição química do extrato das folhas secas de *C. verticillata* obtida pelo método de UPLC-HRMS.

Figura 10 - Cromatograma UPLC-ESI (+) - QToF BPI do extrato aquoso de *Cissus verticillata*.



Fonte: Autora (2019).

A identificação dos principais compostos presente no cromatograma de pico base (BPI) do extrato aquoso de *Cissus verticillata* foi baseada em valores m/z com tolerância de 5 ppm da massa teórica da fórmula molecular proposta, bem como comparando os dados da LC-MS com os dos padrões e as informações bibliográficas.

Os compostos identificados, compreendendo seu tempo de retenção, fórmula molecular, massa monoisotópica experimental e fragmentos majoritários estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Compostos identificados no extrato de *Cissus verticillata* por UPLC-HRMS e dados de MS/MS.

Pico nº	Identificação proposta	TR (min)	Fórmula molecular	m/z [M+H] ⁺ (erro, ppm)	MS/MS íons	MS/MS Referencia
1	Triptofano	1.38	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	205.0978 (0.5)	188.0709 → 170.0630; 146.0608; 144.0806; 143.0793; 142.0603; 118.0652	(WEI et al., 2016)
2	Ácido clorogênico	1.68	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.1027 (-0,6)	163.0392; 145.0283; 135.0449;	(ZHAO et al., 2014)
3	Vicenina-2	1.92	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1661 (0.5)	457.1125; 427.1035; 409.0905; 379.0787; 325.0754	(DE BEER et al., 2012)
4	Orientina	2.13	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.1084 (0.0)	431.0965; 413.0800; 395.0769; 383.0727; 353.0583; 329.0659; 299.0557	(LEBA et al., 2016)
5	Luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	2.29	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.1663 (0.0)	449.1073; 287.0557	(XU et al., 2017)
6	Apigenina-7- <i>O</i> -rutinosídeo	2.53	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.1719 (0.9)	433.1131; 271.0593	(XU et al., 2017)
7	Cumarina	2.92	C ₉ H ₆ O ₂	147.0445 (-2)	N.D.	-
8	Luteolina	3.35	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.0554 (-1,0)	153.0187; 135.0449;	(CUYCKENS, 2004)

Fonte: Autora (2019).

A identificação dos compostos foi realizada pelo método de ionização positiva, pois o modo negativo apresentou o mesmo perfil cromatográfico. A análise de UPLC-HRMS permitiu a caracterização de oito compostos no extrato aquoso de *Cissus verticillata*.

O pico 1 originou o íon pico base m/z 205,0978 que proporcionou os íons filhos m/z 188,0709 $[M+H-NH_3]^+$, 170,0630 $[M+H-NH_3-H_2O]^+$, 144,0806 $[M+H-NH_3-H_2O-CO_2]^+$ e 118,0652 $[Indol+H]^+$. Estes dados de MS² em conjunto com os reportados na literatura permitiram atribuir este composto como triptofano (WEI et al., 2016).

O segundo metabólito m/z 355,1027 (pico 2) forneceu m/z 163,0392 $[M+H-ácido\ quínico]^+$, 145,0283 $[M+H-ácido\ quínico-H_2O]^+$ e 135,0449 $[M+H-ácido\ quínico-CO]^+$ como íons fragmento. Este perfil químico está de acordo com os dados anteriormente relatados para o ácido clorogênico (ZHAO et al., 2014). O pico 3, m/z 595,1661 forneceu os íons fragmento m/z 457,1125; 427,1035; 409,0905; 379,0787 e 325,0754 típicos dos relatados para a flavona-C-diglicosilada (vicenina-2). Baseado na literatura, o mecanismo de fragmentação para este composto passa pela eliminação de água seguida pela fragmentação de Retro-Diels-Alder e com eliminação de CH₂O da porção do açúcar (DE BEER et al., 2012).

O pico 4, m/z 449,1084 revelou ser outra flavona-C-glicosilada (orientina). Apresentando os fragmentos m/z 431,0965 $[M+H-H_2O]^+$, 413,0800 $[M+H-2H_2O]^+$, 395,0769 $[M+H-3H_2O]^+$ e 383,0727 $[M+H-2H_2O-CH_2O]^+$. Outros dois fragmentos mais intensos foram observados em m/z 329,0659 e 299,0557, dentre os quais o primeiro foi formado a partir da perda de água seguida da abertura de Retro-Diels-Alder da porção de açúcar. O segundo fragmento m/z 299,0557 mostrou uma diferença de 30 Da a partir do primeiro, sugerindo a perda de formaldeído a partir de m/z 329,0659 (LEBA et al., 2016). Os picos 3 e 4 são dois metabólitos previamente obtidos das folhas de *C. verticillata* (BARBOSA et al., 2013).

Os dados MS² dos picos 5 e 6 sugeriram dois flavonoides-O-glicosídeos, nomeadamente luteolina-7-O-rutinosídeo e apigenina-7-O-rutinosídeo, respectivamente. A fragmentação de ambos os íons demonstra a perda de uma unidade de desoxihexose (146 Da) dos precursores, seguida por uma perda de uma unidade de hexose (162 Da) que conduziu à porção aglicona (Tabela 1). A falta de íons correspondentes a $[M+H-hexose]^+$ no espectro MS/MS, indicou que a desoxihexose estava ligada à unidade de hexose. Além disso, o pico 5 proporcionou m/z 287,0557 correspondente a porção aglicona, podendo ser kaempferol ou luteolina. No entanto, os máximos de absorção de UV a 254 e 346 nm registrados pelo detector de PDA foram compatíveis com os relatados para a luteolina (BERTONCELJ et al., 2011). O pico 6, por sua vez, mostrou o seu fragmento de aglicona m/z 271,0593, que foi deduzido como apigenina.

A estrutura dos picos 7 e 8 foi atribuída como cumarina (1,2-benzopirona) e luteolina, respectivamente, comparando os tempos de retenção com os dos padrões analíticos.

A identificação dos compostos foi realizada pelo método de ionização positiva, pois o modo negativo apresentou o mesmo perfil cromatográfico. A análise de UPLC-HRMS permitiu a caracterização de oito compostos no extrato aquoso de *Cissus verticillata*.

O pico 1 originou o íon pico base m/z 205,0978 que proporcionou os íons filhos m/z 188,0709 $[M+H-NH_3]^+$, 170,0630 $[M+H-NH_3-H_2O]^+$, 144,0806 $[M+H-NH_3-H_2O-CO_2]^+$ e 118,0652 $[Indol+H]^+$. Estes dados de MS² em conjunto com os reportados na literatura permitiram atribuir este composto como triptofano (WEI et al., 2016).

O segundo metabólito m/z 355,1027 (pico 2) forneceu m/z 163,0392 $[M+H-ácido\ quínico]^+$, 145,0283 $[M+H-ácido\ quínico-H_2O]^+$ e 135,0449 $[M+H-ácido\ quínico-CO]^+$ como íons fragmento. Este perfil químico está de acordo com os dados anteriormente relatados para o ácido clorogênico (ZHAO et al., 2014). O pico 3, m/z 595,1661 forneceu os íons fragmento m/z 457,1125; 427,1035; 409,0905; 379,0787 e 325,0754 típicos dos relatados para a flavona-C-diglicosilada (vicenina-2). Baseado na literatura, o mecanismo de fragmentação para este composto passa pela eliminação de água seguida pela fragmentação de Retro-Diels-Alder e com eliminação de CH₂O da porção do açúcar (DE BEER et al., 2012).

O pico 4, m/z 449,1084 revelou ser outra flavona-C-glicosilada (orientina). Apresentando os fragmentos m/z 431,0965 $[M+H-H_2O]^+$, 413,0800 $[M+H-2H_2O]^+$, 395,0769 $[M+H-3H_2O]^+$ e 383,0727 $[M+H-2H_2O-CH_2O]^+$. Outros dois fragmentos mais intensos foram observados em m/z 329,0659 e 299,0557, dentre os quais o primeiro foi formado a partir da perda de água seguida da abertura de Retro-Diels-Alder da porção de açúcar. O segundo fragmento m/z 299,0557 mostrou uma diferença de 30 Da a partir do primeiro, sugerindo a perda de formaldeído a partir de m/z 329,0659 (LEBA et al., 2016). Os picos 3 e 4 são dois metabólitos previamente obtidos das folhas de *C. verticillata* (BARBOSA et al., 2013).

Os dados MS² dos picos 5 e 6 sugeriram dois flavonoides-O-glicosídeos, nomeadamente luteolina-7-O-rutinosídeo e apigenina-7-O-rutinosídeo, respectivamente. A fragmentação de ambos os íons demonstra a perda de uma unidade de desoxihexose (146 Da) dos precursores, seguida por uma perda de uma unidade de hexose (162 Da) que conduziu à porção aglicona (Tabela 1). A falta de íons correspondentes a $[M+H-hexose]^+$ no espectro MS/MS, indicou que a desoxihexose estava ligada à unidade de hexose. Além disso, o pico 5 proporcionou m/z 287,0557 correspondente a porção aglicona, podendo ser kaempferol ou luteolina. No entanto, os máximos de absorção de UV a 254 e 346 nm registrados pelo detector de PDA foram compatíveis com os relatados para a luteolina (BERTONCELJ et al., 2011). O pico 6, por sua vez, mostrou o seu fragmento de aglicona m/z 271,0593, que foi deduzido como apigenina.

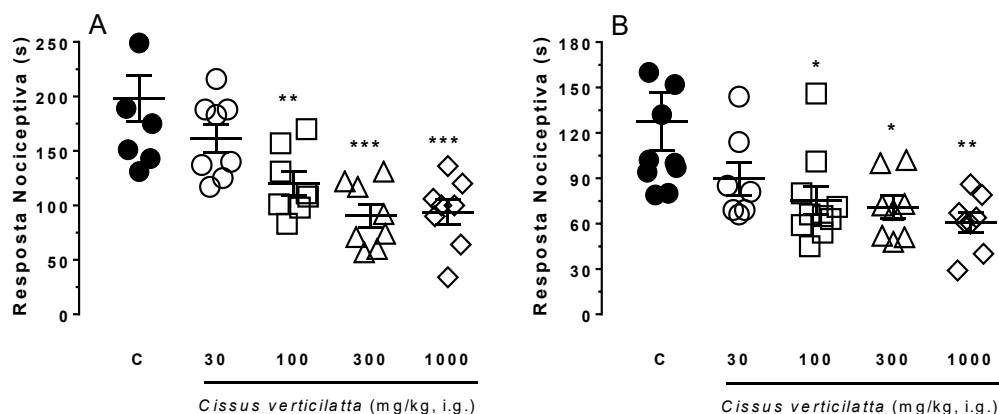
A estrutura dos picos 7 e 8 foi atribuída como cumarina (1,2-benzopirona) e luteolina, respectivamente, comparando os tempos de retenção com os dos padrões analíticos.

3.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA (ANALGÉSICA)

3.4.1 Efeito do extrato aquoso das folhas secas de *Cissus verticillata* (EACv) na nocicepção induzida pelo metilglioxal

A injeção intraplantar de metilglioxal (300 $\mu\text{g/pata}$) causou um comportamento de nocicepção, caracterizado por mordida e lambida na pata dos animais do grupo controle, como pode ser observado na Fig. 12. O tratamento intragástrico dos camundongos fêmeas ($F_{(4, 35)}=11,27, p < 0,001$) ou machos ($F_{(4, 38)}=4,73, p < 0,001$) com EACv (30 – 1000 mg/kg), reduziu de forma significativa e dose dependente com eficácia semelhante o comportamento nociceptivo induzido pelo metilglioxal em relação ao grupo controle (Fig. 12 A e B). As inibições observadas para os camundongos fêmeas foram de $18\pm 6\%$, $39\pm 5\%$, $54\pm 5\%$ e $53\pm 6\%$ para as doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg do EACv (Fig. 12 A). Para os camundongos machos, as inibições foram de $30\pm 9\%$, $41\pm 7\%$, $54\pm 6\%$ e $52\pm 5\%$ para as doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg do EACv, respectivamente (Fig. 12 B).

Figura 11 - Efeito da *Cissus verticillata* no comportamento nociceptivo induzido por metilglioxal em camundongos



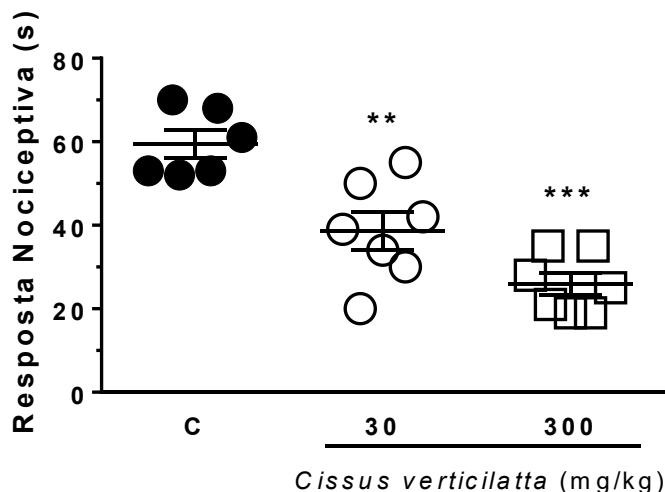
Painel A, camundongos fêmeas; Painel B, camundongos machos. Cada grupo representa a média dos valores obtidos a partir de 7-10 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os círculos fechados correspondem aos animais do grupo controle (C), as formas geométricas abertas correspondem aos animais tratados com EACv (30 – 1000 mg/kg, i.g.). Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Fonte: Autora (2019).

3.4.2 Efeito da *Cissus verticillata* no comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina

Os resultados apresentados na Fig. 12 indicam que a administração do EACv em camundongos fêmeas, na dose não efetiva (30 mg/kg, i.g.) ou efetiva (300 mg/kg) na nocicepção induzida pelo metilglioxal, foi capaz de reduzir de maneira dose dependente e significativa ($F_{(2, 17)} = 21,23, p < 0,001$) o comportamento nociceptivo induzido pela capsaicina quando comparado ao grupo controle. As inibições observadas foram de $35 \pm 8\%$ na dose de 30 mg/kg e $56 \pm 4\%$ na dose de 300 mg/kg do EACv.

Figura 12 - Efeito da *Cissus verticillata* no comportamento nociceptivo induzido por capsaicina em camundongos fêmeas



Cada grupo representa a média dos valores obtidos a partir de 6-7 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os círculos fechados correspondem aos animais do grupo controle (C), as formas geométricas abertas correspondem aos animais tratados com EACv (30 ou 300 mg/kg, i.g.). Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

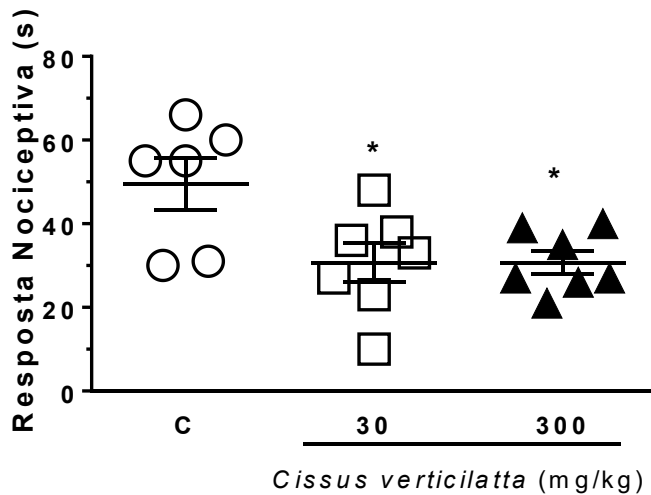
Fonte: Autora (2019).

3.4.3 Efeito da *Cissus verticillata* no comportamento nociceptivo induzido pelo cinamaldeído

Os resultados apresentados na Fig. 13 indicam que a administração do EACv em camundongos fêmeas, na dose não efetiva (30 mg/kg, i.g.) ou efetiva (300 mg/kg) na nocicepção induzida pelo metilglioxal, foi capaz de reduzir de maneira significativa ($F_{(2, 17)} = 5,31, p = 0,016$) o comportamento nociceptivo induzido pelo cinamaldeído quando comparado

ao grupo controle. As inibições observadas foram de $37\pm 9\%$ na dose de 30 mg/kg e $37\pm 6\%$ na dose de 300 mg/kg do EACv.

Figura 13 - Efeito da *Cissus verticillata* no comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído em camundongos fêmeas



Cada grupo representa a média dos valores obtidos a partir de 6-7 animais e as linhas verticais indicam E.P.M. Os círculos fechados correspondem aos animais do grupo controle (C), as formas geométricas abertas correspondem aos animais tratados com EACv (30 ou 300 mg/kg, i.g.). Os asteriscos (*) denotam os níveis de significância, quando comparado com o grupo controle (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). A significância estatística foi determinada com ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Fonte: Autora (2019).

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A *Cissus verticillata* é uma planta popularmente conhecida e utilizada para o tratamento de diabetes mellitus, sendo esta uma doença crônica com muitas complicações, associada ao aumento da mortalidade e morbidade e comprometimento da qualidade de vida. De acordo com IDF (2015), a dor neuropática é uma das principais complicações causadas pela hiperglicemia. Entretanto, na literatura científica não foi encontrado estudos correlacionando a dor associada à diabetes com o uso de *Cissus verticillata*. Neste trabalho, foi demonstrado que o extrato aquoso das folhas de *Cissus verticillata* é capaz de reduzir a nocicepção (dor) associado à diabetes, a qual é dependente, pelo menos em parte, pela produção de metilglioxal gerado pelo metabolismo da glicose decorrente da hiperglicemia.

A população ainda utiliza a plantas *Cissus verticillata* como anticonvulsivante, anti-inflamatória, antirreumática, antitérmica, anti-hipertensivo (OLIVEIRA et al., 2012; DROBNIK; OLIVEIRA, 2015; SALGADO, 2009; LINO et al., 2008; PEPATO et al., 2003), antigripal, contra infecções respiratórias (GARCIA et al., 2000), dislipidemia, problemas urinários (LANS, 2006).

Em relação à constituição fitoquímica da *Cissus verticillata*, os nossos dados corroboram com os achados descritos na literatura. De fato, foi observado que as folhas de *Cissus verticillata* é rica em flavonoides (vicenina-2, orientina, luteolina-7-O-rutinosídeo e apigenina-7-O-rutinosídeo, aglicona correspondente a kaempferol ou luteolina e cumarina) que lhe confere atividade biológica como antioxidante e anti-inflamatório; bem como em polifenóis (ácido clorogênico) que lhe atribui atividade antioxidante, anti-inflamatória e antialérgica; cumarina, um popular anticoagulante e triptofano, que é precursor da serotonina.

De acordo com Oliveira et al. (2012), os compostos biologicamente ativos são os taninos, esteroides e triterpenos, aminoácidos, cetoesteroides, carotenoides, vitamina E, alcaloides, canferol, compostos graxos e flavonoides, mais especificamente, kaempferol, luteolina e luteolina-3'-sulfato, sendo o kaempferol, luteolina também encontrados na nossa amostra. O trabalho de Salgado (2009) também identificou cumarinas, saponinas e taninos.

Como descrito anteriormente, a *Cissus verticillata* é utilizada na medicina popular no tratamento da diabetes. Salienta-se que a dor na diabetes é um sintoma grave que prejudica e reduz drasticamente a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Não obstante, os pacientes com neuropatia diabética apresentam sinais e sintomas como dor espontânea ou evocada devido aos danos produzidos nos nervos periféricos, sendo que a dor evocada manifesta-se geralmente como alodínia ou hiperalgesia. Os pacientes posteriormente passam a apresentar sinais e

sintomas caracterizados por perda de sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos, com aumento do risco de lesões e conseqüentemente amputações (ARAYA, 2017).

Devido a disfunções em células gliais, danos nos elementos vasculares, tecido conjuntivo, desmielinização e perda de fibras do sistema nervoso periférico, os pacientes com neuropatia diabética apresentam sintomas negativos e positivos. Os sintomas negativos mais importantes são a perda de sensibilidade ao frio, calor, vibração e dor e ulceração. Sintomas positivos geram uma maior preocupação aos pacientes, os sintomas são: queimação, choque e a dor, sendo estes os sintomas mais comuns. As alterações na percepção de estímulos mecânicos, químicos e térmicos são importantes critérios no processo de diagnóstico de neuropatia diabética. As anormalidades térmicas são mais comuns que as alterações sensoriais mecânicas e químicas, sendo estes presentes em todas as fases da doença (JESUS, 2015).

Sabe-se hoje que o diabetes está associado ao stress oxidativo. A formação dos AGEs foi proposta como biomarcadores para algumas desordens do metabolismo humano. Um aumento na produção de EROs no organismo acarreta danos oxidativos a lipídeos e proteínas. Além disto, desordens como o diabetes envolve um acúmulo dos produtos da glicação avançada, sendo o metilglioxal, a 3-deoxiglucosona e a aminoacetona os exemplos de catabólitos associados a diabetes (SARTORI; BECHARA, 2010). Barragán-iglesias et al. (2018) destaca em seu trabalho que a neuropática diabética tem sido relacionada à produção excessiva de metilglioxal, o qual é degradado por enzimas chamadas glioxalases, que também têm sido associadas a neuropatias dolorosas. Estudos mostraram que em indivíduos saudáveis as concentrações plasmáticas de MG são baixas, na ordem de 100 a 250 nM, enquanto, que em pacientes com neuropatia diabéticas essa concentração está elevada variando entre 500 e 5000 nM. Esses dados corroboram com os achados de Huang et al. (2015), que demonstram que em pacientes diabéticos ocorre o aumento da concentração plasmática de metilglioxal. Além disto, estudos também mostram que o MG em concentrações elevadas é capaz de ativar o canal de sódio Nav1.8 e o TRPA1.

Diante do exposto acima, fica evidente que o metilglioxal parece ser um importante mediador endógeno responsável pela indução da neuropatia diabética tanto em pacientes diabéticos quanto para animais (camundongos e ratos) com diabetes. Assim, pode-se considerar a utilização do MG como uma ferramenta farmacológica útil na pesquisa de futuros produtos com potencial ação na dor neuropática associada à diabetes.

No presente estudo foi demonstrado que o extrato da *Cissus verticillata* (EACv) promoveu redução significativa e dependente da dose da nocicepção espontânea induzida pelo metilglioxal em camundongos (Fig. 12). Observamos também que a eficácia do EACv foi

semelhante em camundongos machos e fêmeas, sugerindo que o seu efeito independente do sexo. De fato, o EACv (300 mg/kg), administrado pela via oral, reduziu a nocicepção causada pelo MG em camundongos fêmeas em $54\pm 5\%$ e a inibição em camundongos machos foi $54\pm 6\%$ (Fig. 12). Uma vez que o EACv, nas doses de 300 e 1000 mg/kg, reduziu mais de 50% a nocicepção induzida pelo MG. Tal observação claramente mostra que a *Cissus verticillata* pode reduzir a nocicepção associado à diabetes. Assim, este dado está de acordo, pelo menos em parte, com os achados na literatura, o qual demonstra que MG está envolvido na patogênese da neuropática diabética. Ademais, os resultados do estudo de Anderson et al. (2013), ampara nossos resultados assegurando que mesmo na ausência de hiperglicemia, mas em concentrações aumentadas de MG este é capaz de produzir uma neuropatia sensorial semelhante à observada em pacientes diabéticos e em modelos animais experimentais de diabetes.

De acordo com Chang et al. (2016) o acúmulo de MG pode causar morte de célula beta-pancreática responsável pela produção de insulina, uma vez que a apoptose das células beta-pancreáticas resulta na diminuição na produção de insulina, que causaria um aumento da glicose, caracterizando o diabetes, bem como todas as complicações da mesma, incluindo a dor neuropática como já vista anteriormente. Além disto, os nossos dados também fornecem subsídios científicos para um novo conceito de intervenção terapêutica da *Cissus verticillata* no controle da neuropatia diabética.

O mecanismo para explicar a dor neuropática não está ainda bem elucidado, uma das hipóteses mais aceitas é a geração ectópica de impulsos nervosos nas fibras sensorial do tipo fibras C e fibras A δ , que apresentam terminações livres e são responsivas a estímulos nocivos (ARAYA, 2017). Bierhaus et al. (2012) confirmaram que o mecanismo da hiperalgesia metabólica realmente é dependente do metabólito glicolítico MG. Os autores observaram que indivíduos com dor apresentavam níveis plasmáticos de MG acima de 600 nM. Além disto, foi observado que o MG despolarizava os neurônios sensoriais por meio da abertura de canais de sódio Nav1.8 promovendo facilitação dos disparos de neurônios nociceptivos, sendo esta resposta dependente da inativação lenta de canal de sódio Nav1.7. Por outro lado, foi observado que camundongos tratados com MG apresentaram redução da velocidade de condução nervosa, facilitação da liberação de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), além da indução de hiperalgesia mecânica.

Conforme mencionado anteriormente, o MG é capaz de estimular diretamente o canal iônico TRPA1 por meio de uma interação intracelular reversível e aumentar a excitabilidade elétrica e facilitar o disparo de neurônios nociceptores (BARRAGÁN-IGLESIAS et al., 2018;

HUANG et al., 2015; ANDERSSON et al., 2013). Ademais, a expressão dos receptores TRPA1 e TRPV1 é induzida tanto após lesões inflamatórias como após lesão de nervos (NUCCI, 2014).

Diante disto, no presente estudo também foi investigado se o EACv seria capaz de reduzir a nocicepção causada pela capsaicina e cinamaldeído, agonista dos receptores TRPV1 e TRPA1, respectivamente (JESUS, 2015; NUCCI, 2014).

Como pode ser observado na figura 13 e 14, o EACv promoveu redução da nocicepção espontânea causada pela injeção intraplantar de capsacina (agonista TRPV1) e de cinamaldeído (agonista TRPA1) em camundongos fêmeas. Além disto, podemos observar que o EACv foi mais eficaz na nocicepção causada pela capsaicina do que a causada pelo cinamaldeído. Ademais, pode-se observar que o efeito antinociceptivo promovido pelo EACv na nocicepção causada pela capsaicina foi dependente da dose, ou seja, as inibições observadas do EACv foram de $35\pm 8\%$ e $56\pm 4\%$, respectivamente, para as doses de 30 mg/kg e 300 mg/kg (Fig. 13). É importante salientar que a dose de 30 mg/kg do EACv foi inativa, enquanto que a dose de 300 mg/kg reduziu a nocicepção induzida pelo MG (Fig. 12). Por outro lado, o efeito promovido pelo EACv na nocicepção causada pelo cinamaldeído não foi dependente da dose, ou seja, as inibições observadas para a dose não efetiva (30 mg/kg) ou efetiva (300 mg/kg) do EACv na nocicepção induzida pelo MG, foram respectivamente de $37\pm 9\%$ e $37\pm 6\%$ (Fig. 14). Tal observação permite sugerir que a *Cissus verticillata* possui princípios ativos que atuam bloqueando, pelo menos em parte, os receptores TRPV1 e TRPA1. A ação em TRPA1 é importante e reafirma o potencial do EACv na dor associada a diabetes, uma vez que, o metilglioxal é capaz de ativar diretamente o receptor TRPA1. Já ação do EACv em receptores TRPV1 é interessante e abre uma nova perspectiva de estudos futuros. Por outro lado, o efeito da EACv na nocicepção do metilglioxal e TRPA1 fornece, pelo menos em parte, a evidencia científica e a “prova de conceito” para o uso popular da *Cissus verticillata* no tratamento da diabetes. Entretanto, os nossos dados suportam apenas que a *Cissus verticillata* foi capaz de reduzir a dor associada a diabetes.

O estudo de Pepato et al. (2003), mostrou que o extrato hidroalcoólico de 150g das folhas de *Cissus verticillata* para 1L de água após decocção teve rendimento de 94%, quando administrado agudamente promoveu uma pequena redução da glicemia em ratos, porém não significativa quando comparados com o controle. Todavia, a administração oral prolongada (forma crônica) do extrato promoveu redução significativa no consumo de alimento e volume urinário, bem como diminuição da glicemia e glicosúria em comparação com os ratos controles (PEPATO et al, 2003). Por outro lado, o estudo de Beltrame et al. (2001) mostrou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus verticillata* na dose de 1,0g/Kg não reduziu a glicemia em

comparação ao controle e, não foi capaz de reduzir a tolerância a glicose induzida por dexametasona.

Resendo (2009), realizou um estudo comparativo entre pacientes portadores de diabetes tipo 2 com idade entre 30 e 80 anos, sendo um grupo tratado com glibenclamida (grupo controle) e outro tratado com o infuso de 1g do pó das folhas de *Cissus verticillata*, em 150ml de água em ebulição. O infuso foi ingerido em jejum por um período de 8 semanas. A avaliação clínica se deu por análise dos níveis de glicose no sangue e na saliva. Os resultados demonstraram que o infuso de *Cissus verticillata* teve efeito hipoglicemiante quando comparado com o controle, tanto nas análises salivares quanto sanguíneas (RESENDO, 2009).

Finalmente, o estudo de Vasconcelos et al. (2007) evidenciou que o extrato aquoso das folhas de *Cissus verticillata* apresenta toxicidade aguda relativamente baixa para camundongos. A DL_{50} observada foi superior a 5,0 g/kg (via oral), entretanto, foram observadas alterações nas transaminases AST e ALT e na fosfatase alcalina, caracterizando então alterações hepáticas. Na avaliação histológica do fígado de camundongos, evidenciou-se hepatite reacional com portite linfocitária crônica e lobular multifocal, hiperplasia kupferiana, colapsos focais da trama reticular, ausência de fibrose portal e lobular, sugerindo uma hepatite. Tal observação foi associada ao uso de doses (> 5 g/kg) elevadas de *Cissus verticillata* (VASCONCELOS et al., 2007). Contudo, no nosso estudo foi observado que a dose de 300 mg/kg foi a mais efetiva e ela é cerca de 16 vezes menor que a dose utilizada no estudo de Vasconcelos et al. (2007). Contudo, estudos de toxicidade adicionais são necessários para verificar a segurança do EACv.

Em síntese, os resultados do presente estudo, indicam que os princípios ativos presente no extrato aquoso de *Cissus verticillata* apresenta importante efeito antinociceptivo (analgésico) no modelo de nocicepção causado pelo MG que está associado a dor relacionada a diabetes. Contudo, o fato do extrato e princípios ativos de *Cissus verticillata* serem efetivos no modelo de nocicepção causada pela capsaicina e cinamaldeído, sugerem fortemente um mecanismo de ação relacionado aos receptores TRPV1 e TRPA1. A possibilidade da *Cissus verticillata* estar interagindo com outros receptores ou mediadores envolvidos na patogênese da dor associada a diabetes não pode ser também descartada. Essa hipótese, porém, precisa ser melhor investigada experimentalmente.

Esses resultados corroboram os achados descritos na literatura e abrem, portanto, novas perspectivas para o uso da *Cissus verticillata* no tratamento da dor, em especial da dor associada a diabetes, e podem também contribuir para explicar seus efeitos benéficos já confirmados no tratamento da diabetes.

REFERÊNCIAS

- ALIPI, M. H.; PICHARDO, J. M. **Vitaceae - Cissus verticillata (L.) Tripa de vaca**. 2007. Disponível em: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/vitaceae/cissusverticillata/fichas/ficha.htm>. Acesso em: 22 dez. 2018.
- ANDERSSON, David A. *et al.* Methylglyoxal Evokes Pain by Stimulating TRPA1. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 77-86, out. 2013.
- ARAYA, Erika Ivanna. **Papel dos receptores TRPV1 periféricos e centrais na hiperalgesia térmica orofacial em modelo de diabetes em ratos**. 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2017.
- BARBOSA, W. L. R. *et al.* Characterisation of flavonoid glycosides in pharmacopoeial preparation of *Cissus verticillata* (L) Nicolson & C.E. Jarvis) using HPLC-DAD and HPLC-MS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 10, p. 3871, 2013.
- BARRAGÁN-IGLESIAS, Paulino *et al.* Activation of the integrated stress response in nociceptors drives methylglyoxal induced pain. **International Association For The Study Of Pain**, Dallas, p. 1-40, 2018.
- BELTRAME, Flávio Luis *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *cissus sicyoides* L (vitaceae) **Química Nova**, Maringá, v. 24, n. 6, p. 783-785, fev. 2001.
- BELTRAME, Flavio Luis *et al.* Evaluation of the Antidiabetic and Antibacterial Activity of *Cissus sicyoides*. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, Maringa, v. 45, n. 1, p. 21-25, mar. 2002.
- BERTONCELJ, J. *et al.* LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 296-302, 2011.
- BIERHAUS, Angelika *et al.* Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. **Nature Medicine**, Australia, v. 18, n. 6, p. 926-935, jul. 2012.
- BRAGA, Tatiane Vieira. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2008.
- BRAGA, Tatiane Vieira *et al.* Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissusverticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRANDÃO, Jorge. **Dor neuropática VS dor nociceptiva**. 2014. Disponível em: <http://www.avozdermesinde.com/noticia.asp?idEdicao=309&id=9800&idSeccao=3413&Action=noticia>. Acesso em: 16 dez. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 5813**, de 22 de junho de 2006a. Aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas e dá outras providências. Brasília: Presidência da República. 2006. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso em: 16 dez. 2018.

BRASIL. **Cadernos de Atenção Básica - n. 16**: Diabetes Mellitus. Brasília: Editora MS, 2006b.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

CACCIA-BAVA, Maria do Carmo Gullaci Guimarães *et al.* Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 5, p. 1651-1659, 2017.

CASELLINI, Carolina M.; VINIK, Aaron I. Recent advances in the treatment of diabetic neuropathy. **Current Opinion In Endocrinology & Diabetes**, Virginia Usa, v. 13, p. 147-153, 2006.

CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antiabéticas de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v. 86, p. 11-16, 2005.

CHANG, T. J. *et al.* Glucagon-like peptide-1 prevents methylglyoxal-induced apoptosis of beta cells through improving mitochondrial function and suppressing prolonged AMPK activation. **Scientific Reports**, v. 21, n. 6, p. 23403, mar. 2016.

CHARA, A. R. Efeito Fisiológico das Incretinas. **Jonhs Hopikins Advanced Studies in Medicine**, p. 613-617, 2006.

COHEN, Steven P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BJM**, v. 5, n. 348, p. 7656, 2014.

CONCEIÇÃO, Raissa Alves da; SILVA, Paula Nogueira da; BARBOSA, Maria Letícia C. Fármacos para o Tratamento do Diabetes Tipo II: Uma Visita ao Passado e um Olhar para o Futuro. **Rev. Virtual Quim.**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 514-534, fev. 2017. Disponível em: <http://rvq.sbq.org.br/imagebank/pdf/v9n2a05.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2019.

CÓRDOVA, Marina Machado *et al.* Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters**, Florianopolis, v. 495, n. 3, p. 173-177, 2011.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1-15, 2004.

DE BEER, D. *et al.* Food ingredient extracts of *Cyclopia subternata* (Honeybush): variation in phenolic composition and antioxidant capacity. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14602-14624, 2012.

DROBNIK, Jacek; OLIVEIRA, Andreia B. de. *Cissus verticillata* (L.) Nicolson and C.E. Jarvis (Vitaceae): Its identification and use in the sources from 16th to 19th century. **Journal of ethnopharmacology**, v. 171, p. 317-329, 2015.

GARCIA, A. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 71, n. 3, p. 395-400, 2000.

GROENER, Jan Benedikt *et al.* Methylglyoxal and Advanced Glycation End Products in Patients with Diabetes – What We Know so Far and the Missing Links. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, Alemanha, p. 1-8, 2017.

GROSS, Jorge L. *et al.* Diabetes Mellito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p. 16-26, fev. 2002.

HANSON, Fernanda. **Efeitos do metilglioxal em parâmetros comportamentais e neuroquímicos in vivo e ex vivo**. 2015. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

HUANG, Qian *et al.* Methylglyoxal mediates streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain via activation of the peripheral TRPA1 and Nav 1.8 channels. **Metabolismo Clinical and Experimental**, v. 65, n. 4, p. 463-474, dez. 2015.

IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 7. ed. IDF, 2015.

JESUS, Carlos Henrique Alves. **Responsividade dos receptores TRPM8 e TRPA1 no diabetes experimental induzido por estreptozotocina em ratos**. 2015. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

KATZUNG, Bertram G.; MASTERS, Susan B. J.; TREVER, Anthony. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: Amgh, 2014.

KOIVIST, Ari *et al.* TRPA1: A Transducer and Amplifier of Pain and Inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 50-55, 2013.

LANS, Chery A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 13, n. 2, p. 45, oct. 2006.

LEBA, L. J. *et al.* *Oenocarpus bacaba* and *Oenocarpus bataua* Leaflets and Roots: A New Source of Antioxidant Compounds. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 7, p. 1014, 2016.

LINO, Cleide de Sousa *et al.* Antioxidant Activity of a *Cissus verticillata* Fraction and Tyramine, its Bioactive Constituent, on Alloxan-Induced Diabetic Rats. **The Open Pharmacology Journal**, v. 2, n. 1, p. 63-69, 2008.

LIOFILIZAÇÃO. Unilago: Revista Científica Unilago, 2013.

MEDEIROS, Lamara Saron da Silveira *et al.* Importância do controle glicêmico como forma de prevenir complicações crônicas do diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Análise Clínica**, Patos, p. 1-5, mar. 2016.

NUCCI, Catarina. **Potencial Terapêutico do Extrato Etanólico dos Frutos da Pterodon pubescens benth no Controle da Dor Aguda e Crônica**. 2014. 170 f. Dissertação (Mestrado em Neurociência)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

OSADEBE, O. *et al.* Natural Products as Potential Sources of Antidiabetic Drugs. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 17, p. 2075-2095, 2014.

OLIVEIRA, Andréia B. *et al.* Anatomy and histochemistry of the vegetative organs of *Cissus verticillata* - a native medicinal plant of the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1201-1211, dez. 2012.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advance glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin Diabetes**, v. 21, n. 4, p. 187-192, 2003.

PEPATO, Maria Teresa *et al.* *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnol. Appl. Biochem**, Great Britain, v. 37, p. 15-20, 2003.
PICU, Ariana *et al.* Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Romanian Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. **Molecules**, p. 1-14, 2017.

RESENDO, Rosana Araujo. **Evaluation of the effectiveness of *Cissus verticillata* (L.) in people with Diabetes type 2 Melito, through the concentration of glucose in the blood and saliva**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) -Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

SALGADO, Joclem Mastrodi; MANSI, Débora Niero; GAGLIARDI, Antonio. *Cissus sicyoides*: analysis of glycemic control in Diabetic Rats through biomarkers. **Journal of Medicinal Food**, p. 722-727, 2009.

SARTORI, A.; BECHARA, E. J. H. Metilglioxal: uma toxina endógena?. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2193-2201, 2010.

SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. **A História do Diabetes**. 2014. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/historia-do-diabetes>. Acesso em: 05 jan. 2019.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabéticos. **Insulina**. 2019. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/insulina>. Acesso em: 5 jan. 2019.

SCHESTATSKY, Pedro. O Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. **Rev HCPA**, v. 28, n. 3, p. 177-87, 2008.

SILVA, Luciana da *et al.* Bicyclgermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 361-367, 2017.

SILVEIRA, Ana Paula *et al.* Estudo etnobotânico na Educação Básica. **POIÉSIS: Revista do Programa de Pós-Graduação em Educação**, Tubarão, v. 2, n. 1, p. 14-31, jan./jun. 2009.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 2003.

TELES, Diana Isabel Correia. **A Fitoterapia como tratamento complementar na Diabetes mellitus**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Fernando Pessoa, Fernando Pessoa, 2013.

UAZMAN, Alan *et al.* **General aspects of diabetes mellitus**. 2014 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1> Get rights and content. Acesso em: 3 jan. 2019.

VASCONCELOS, Tereza Helena Cavalcanti de *et al.* Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Paraíba, v. 4, p. 583-591, 2007.

VASQUEZ, Silvia Patrícia Flores. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidade ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amaz.**, Manaus, v. 44, n. 4, dez. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201400423>. Acesso em: 21 dez. 2018.

VIANA, G. S. B. *et al.* Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **Pharmacology**, v. 4, p. 1-14, 2004.

XU, L. L. *et al.* Analysis of non-volatile chemical constituents of *Menthae haplocalycis* herba by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. **Molecules**, v. 22, n. 10, p. 1756, 2017.

WEI, F. *et al.* Developing an absorption-based quality control method for Hu-Gan-Kang-Yuan capsules by UFLC-QTOF-MS/MS screening and HPLC-DAD quantitative determination. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 592, 2016.

ZHAO, Y. *et al.* UFLC/MS-IT-TOF guided isolation of anti-HBV active chlorogenic acid analogues from *Artemisia capillaris* as a traditional Chinese herb for the treatment of hepatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 147-154, 2014.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, jun. 1983.