

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS ILHOTAS DE LANGERHANS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM EXTRATOS DE *Azadirachta indica* (NEEM) E ESTREPTOZOTOCINA 6 CH

MORPHOMETRIC EVALUATION OF THE ISLETS OF LANGERHANS OF DIABETIC RATS TREATED WITH EXTRACTS OF *Azadirachta indica* (NEEM) AND STREPTOZOTOCIN 6C

M. F. ROSA¹, M. R. PACHECO¹, A. M. GIRARDI^{1*}, M. H. M. SILVA¹,
E. SANTOS¹, S. M. BARALDI-ARTONI¹

RESUMO

Foram avaliados os efeitos dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *Azadirachta indica*, A. Juss e da estreptozotocina 6 CH sobre a morfometria das ilhotas de Langerhans de ratos com diabetes mellitus induzida por estreptozotocina. Os resultados morfométricos indicam que área e o perímetro do grupo controle apresentaram valores médios maiores quando comparados aos demais grupos, formados por animais diabéticos, os quais não diferiram entre si. O diâmetro mínimo do grupo tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10% revelou-se com maior valor confrontado ao grupo controle. Não se observou diferenças significativas entre os todos os grupos tratados e o grupo controle diabético. Portanto, conclui-se que os tratamentos analisados não tiveram efeito significativo quanto à morfometria das ilhotas pancreáticas, ou seja, não induziram a regeneração do pâncreas endócrino em animais diabéticos durante o intervalo de tempo deste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Agentes hipoglicemiantes. Diabetes mellitus. Fitoterapia. Homeopatia.

SUMMARY

The effects of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Azadirachta indica*, A. Juss and streptozotocin 6 CH on the morphometrics of the islets of Langerhans in streptozotocin-induced diabetic rats were evaluated. The morphometric results indicate that the area and the perimeter of the control group have higher means compared to the other groups of diabetic animals, which did not differ among themselves. The minimum diameter of the group treated with aqueous extract of *Azadirachta indica*, A. Juss 10% was larger than the control group. There were no significant differences between treated groups and diabetic control group. Therefore, we concluded that the treatments studied do not induce the regeneration of endocrine pancreas of diabetic animals because they had no significant effect on the morphometrics of pancreatic islets during the period of this study.

KEY-WORDS: Diabetes mellitus. Herbal medicine. Homeopathy. Hypoglycemic agents.

¹ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus Jaboticabal.

* Corresponding author: annitamgirardi@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os hormônios pancreáticos são sintetizados em grupamentos arredondados de células epiteliais endócrinas chamados ilhotas de Langerhans (SCHOSSLER, 2004). As células β , secretoras de insulina, perfazem 70% da ilhota (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004) e ocupam a região central desta (JOHNSON, 2000). Dentro das células, os hormônios são armazenados em grânulos (BERNE et al., 2000). A insulina reduz as concentrações sanguíneas de glicose, ácidos graxos e aminoácidos e promove a conversão desses compostos em sua forma de armazenamento (CUNNINGHAM, 1999). O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por glicemia elevada pela deficiência e/ou resistência à insulina, com várias complicações graves como problemas macrovasculares, microangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatia (RANG et al., 2004), consequências principalmente da hiperglicemia, que deve ser controlada rigorosamente (COTRAN et al., 2000). Nas ilhotas, causa redução de seu número e tamanho, infiltração leucocitária, desgranulação das células β pela depleção da insulina armazenada e substituição amilóide no diabetes tipo 2 (COTRAN et al., 2000). No que diz respeito à indução do diabetes mellitus, Furlan (2001) relatou que grande parte das alterações que aparecem após o tratamento com estrepto-zotocina são decorrentes de sua ação tóxica sobre as células β , ao se acumular nas porções centrais das ilhotas pancreáticas. Marles & Farnsworth (1999) sugeriram que a estrepto-zotocina estimula a produção de radicais livres, o que leva a destruição e disjunção das células β .

A *Azadirachta indica*, conhecida como Neem, é uma planta indiana (CHOPRA, 1958; SAXENA, 1993) introduzida no Brasil em 1993 pela EMBRAPA - CNPAF, em Goiânia - GO. Atualmente, sabe-se que possui uma grande concentração de terpenóides responsáveis pelas suas ações terapêuticas (RAGASA et al., 1997). Vários estudos indicam efeitos benéficos da planta no tratamento do diabetes mellitus. A comparação da ação hipoglicemiante de algumas plantas medicinais demonstrou que o extrato das folhas da *Azadirachta indica* foi o mais potente delas (ALAM et al., 1990). Chattopadhyay (1999) relata que o efeito hipoglicemiante do extrato de suas folhas pode ser devido ao bloqueio do efeito inibitório da serotonina sobre a liberação de insulina mediada pela glicose. Parshad et al. (1999) encontraram melhora significativa nos pesos e diminuição da mortalidade de ratos com diabetes induzida por estrepto-zotocina tratados com extrato aquoso da *Azadirachta indica*. Khosla et al. (2000) confirmaram seu efeito hipoglicemiante em coelhos diabéticos aloxânicos tratados com extratos das folhas e óleo das sementes. Biswas et al. (2002) descreveram que o extrato aquoso de suas folhas, quando fornecido oralmente, reduz a glicemia em ratos normais e diabéticos, possivelmente devido à presença de um flavonóide, a quercetina.

Efeito hipoglicêmico significante também foi observado pela alimentação de coelhos normais e com

diabetes induzido pelo aloxano, em jejum, com óleo da *Azadirachta indica*, assim como pelo extrato de folhas e óleo de sementes. Hussain (2002) demonstrou que o tratamento aquoso da *Azadirachta indica* tem efeito favorável sobre a glicemia e tolerância à glicose, reduziu os lipídios séricos e o peso corporal, além de reverter completamente as anormalidades da retina e a inflamação dos membros dos animais. Mahdi et al. (2003) concluíram que a *Azadirachta indica* e as demais espécies testadas não são úteis no controle dos níveis de peroxidação de lipídios, mas eficazes no reforço do potencial antioxidante em ratos diabéticos estrepto-zotocínicos.

Segundo Gupta et al. (2004), os tratamentos orais de ratos diabéticos estrepto-zotocínicos com extratos da amêndoa e da casca das sementes de *Azadirachta indica*, por 28 dias, previnem o estresse oxidativo causado pela estrepto-zotocina no coração e eritrócitos. Waheed et al. (2006) descreveram que a *Azadirachta indica* teve atividade hipoglicêmica em dose alta sobre pacientes diabéticos tipo 2 tratados durante 14 dias, e pode ser combinada com sucesso com agentes hipoglicemiantes orais em casos nos quais o diabetes não é controlado apenas com estas drogas. Chandra et al. (2007) relataram que os extratos aquosos de certas plantas, incluindo a *Azadirachta indica*, possuem atividades antidiabéticas e antioxidativas e o seu uso apropriado na dieta pode ajudar a minimizar as complicações relacionadas a esta doença. Mostofa et al. (2007) relataram que os extratos de *Catharanthus roseus*, *Azadirachta indica* e *Allium sativum* aumentaram o ganho de peso corporal e diminuíram a glicose sanguínea de ratos diabéticos induzidos por estrepto-zotocina quando comparado com a droga glimepirida. Ebong et al. (2008), tratando ratos diabéticos com extrato de *Azadirachta indica*, mostrou que uma dose única provoca um pico de redução da glicemia uma hora após sua administração. Seu extrato, sozinho e combinado ao extrato de *Vernonia amygdalina*, reduziu a glicemia dos animais ao final do tratamento. Atangwho et al. (2010) concluíram que a glicemia diminuiu em ratos saudáveis e diabéticos tratados com extratos de *Vernonia amygdalina* e *Azadirachta indica*, após sete dias do início do tratamento e ainda mais rapidamente quando administrados em conjunto. Além disso, a variação da glicemia dos ratos tratados com os extratos combinados foi similar à dos animais tratados com insulina, porém mais constante, tendência vista também em relação ao peso corporal dos animais, mas na direção inversa.

Kumari (2010) relata que o pó das sementes de *Azadirachta indica* reduziu a glicemia em jejum e pós prandial de pacientes humanos diabéticos tipo 2, assim como diminuiu os níveis lipídicos sanguíneos médios nestes indivíduos. Porém, Rosa et al. (2010) consideraram duvidoso seu uso no controle da glicemia de ratos diabéticos estrepto-zotocínicos pois os níveis glicêmicos dos animais tratados com extratos aquoso e hidroalcoólico de suas folhas foram maiores que os do grupo controle diabético.

A homeopatia é uma ciência terapêutica baseada na lei natural de cura *Similia similibus curentur* ou “sejam os semelhantes curados pelos semelhantes”. Assim, toda substância capaz de produzir um quadro mórbido em um indivíduo sadio, porém sensível, seria igualmente capaz de, em doses convenientes conforme o caso, curar no indivíduo sensibilizado por uma doença semelhante, excetuando-se as lesões irreversíveis. O fato das diluições succussionadas adquirirem poder dinâmico crescente fez com que os termos diluição, potência e dinamização passassem a ser indistintamente empregados sob o ponto de vista prático (KOSSAK-ROMANACH, 1993). O rato é o modelo mais comumente estudado para elucidar os efeitos terapêuticos de substâncias diluídas e potencializadas (VAN WIJK et al., 2009). Nas preparações em ultra alta diluições, uma substância é diluída sequencialmente a 1:100 (C) e sofre succussão a cada passagem. A sigla CH (centesimal Hahnemanianna) corresponde a uma diluição de 100 vezes e o número que a precede corresponde ao número de passagens (CARVALHO, 2000). Em relação ao tratamento homeopático do *diabetes mellitus*, Santos (1990) verificou ação hipoglicemiante da aloxana 6 CH em ratos diabéticos. Rosa et al. (2010) relataram que ratos com *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina, quando tratados com estreptozotocina 6 CH mostraram, no 30º dia de tratamento, os menores níveis glicêmicos em relação aos grupos controle e diabético e aos animais que receberam extratos aquoso e hidroalcoólico de *Azadirachta indica*.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Para a preparação de ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH) utilizou-se, como ponto de partida, estreptozotocina (Sigma) e como veículo, solução etanólica em diferentes concentrações (30% ou 70%). Realizou-se 100 succussões pelo processo de diluição e succussão mecânicas. A succussão foi executada por meio de movimento contínuo e ritmado, no sentido vertical, de modo a produzir choque do fundo do frasco contra um anteparo semi-rígido. Dispôs-se sobre a bancada seis frascos de 30 mL para atingir a dinamização desejada e colocou-se em cada frasco 19,8 mL de solução etanólica a 70% (V/V). Acrescentou-se no primeiro

frasco 0,2 g de estreptozotocina, homogeneizou-se e succussionou-se 100 vezes em braço mecânico. Obteve-se assim a 1 CH. A partir dessa diluição, procedeu-se de forma idêntica para as preparações subsequentes até atingir a dinamização desejada (6 CH). A preparação 6 CH foi feita em solução etanólica a 30% (V/V). O líquido obtido foi conservado em recipiente de vidro âmbar, bem fechado, protegido do calor e da luz direta. (FARMACOPEIA, 1997).

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

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

Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral (0,2 mL/100 g de animal), através de gavagem, a saber: os grupos controle e controle diabético receberam água; um grupo recebeu extrato aquoso de *Azadirachta indica* a 10%; outro grupo foi tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica* a 10% e o último grupo com estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH). Este procedimento foi realizado durante 30 dias.

No 31º dia, os animais foram sacrificados e o pâncreas, depois de coletado, foi fixado em solução de Bouin por 24 horas e processado, rotineiramente para a inclusão em parafina. Após a microtomia semi-seriada a intervalos de 110 µm, os cortes histológicos, à espessura de 7µm, foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (TOLOSA et al., 2003) e fotomicrografados com auxílio de um fotomicroscópio LEICA DM 5000 B, sendo analisadas 5 lâminas com 5 cortes histológicos por animal, totalizando 25 cortes. Todas as ilhotas de cada corte foram avaliadas. A análise morfológica foi realizada nas ilhotas de

TABELA 1 - Valores de F, coeficiente de variação (CV), médias e desvio padrão (DP) obtidos nas análises de variância para os parâmetros medidos nas ilhotas de Langerhans do pâncreas de ratos machos albinos Wistar, dos grupos controles e tratados.

Tratamento		Área (x10 ³ μm ²)	Diâmetro Máximo (x10 ³ μm)	Diâmetro Mínimo (x10 ³ μm)	Perímetro (x10 ³ μm)	Fator de forma
Controle	Média	8,58 a	0,62 a	0,44 a	0,36 a	2,19 a
	DP	0,87	0,08	0,03	0,04	0,32
Controle Diabético	Média	4,29 b	0,71 a	0,49 ab	0,24 b	2,24 a
	DP	0,49	0,03	0,02	0,02	0,77
Extrato Aquoso de <i>Azadirachta indica</i>	Média	3,22 b	0,71 a	0,53 b	0,24 b	1,92 a
	DP	0,27	0,06	0,07	0,02	0,31
Extrato Hidroalcoólico (70%) de <i>Azadirachta indica</i>	Média	3,70 b	0,63 a	0,49 ab	0,25 b	2,11 a
	DP	1,22	0,01	0,04	0,04	0,28
STZ 6CH	Média	3,51 b	0,65 a	0,49 ab	0,22 b	1,57 a
	DP	0,34	0,06	0,04	0,01	0,29
Teste F		45,17**	2,75**	2,70**	17,65**	1,71**
CV		15,14	8,51	9,00	10,98	21,09

** : significativo a 1% de probabilidade

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Langerhans, medindo-se a área (μm²), o perímetro (μm), os diâmetros máximo (μm) e mínimo (μm) que são, respectivamente, o maior e o menor diâmetro mensurado em cada ilhota; e o fator de forma. O fator de forma está programado, como os demais parâmetros, na memória do programa Image Pro-plus. O menor valor deste fator é igual a 1 (um), significando que a forma do citoplasma e/ou do núcleo apresenta a forma de um círculo perfeito. Quando este fator for maior que a unidade, entende-se que a forma do citoplasma e/ou do núcleo não é perfeitamente circular. As análises propostas foram efetuadas utilizando-se objetiva de pequeno aumento (5x), mediante o programa de análise de imagens (LEICA).

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados morfométricos das variáveis medidas nas ilhotas pancreáticas de ratos machos albinos Wistar estão apresentados na Tabela 1. Os resultados comprovaram que houve diferenças significativas (p<0,01) entre os tratamentos.

A área e o perímetro do grupo controle apresentaram os maiores valores médios ($p < 0,05$) comparados aos demais grupos, os quais não diferiram entre si ($p > 0,05$), o que leva a crer que o diabetes mellitus induziu uma diminuição nestas medidas, concordando com as afirmações de Cotran et al. (2000).

O diâmetro mínimo do grupo tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, A. Juss a 10% revelou-se com maior valor ($p < 0,05$) confrontado ao grupo controle, enquanto os outros grupos não diferiram entre si ($p > 0,05$), em relação a este mesmo parâmetro.

O diâmetro máximo, o fator de forma e o volume revelaram valores médios semelhantes ($p > 0,05$) entre todos os grupos experimentais. O fator de forma, além de não diferir significativamente entre os grupos, apresentou para todos os tratamentos testados e para os grupos controle e controle diabético, valores superiores à unidade, indicando que as ilhotas possuem um contorno arredondado e não perfeitamente circular, morfológicamente normal para esta estrutura do pâncreas. Assim, pode-se concluir que o diabetes mellitus não alterou o formato das ilhotas de Langerhans.

Os resultados obtidos pela análise morfométrica de todos os parâmetros mensurados indicam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos testados e o grupo controle diabético. Desta forma, percebe-se que os tratamentos realizados, no intervalo de tempo utilizado no estudo, não melhoraram as alterações causadas pelo diabetes mellitus nos parâmetros mensurados nas ilhotas de Langerhans, o que pode ser justificado, também pelo período experimental possivelmente curto para o aparecimento de diferenças entre os grupos analisados.

CONCLUSÕES

Conclui-se, mediante os resultados obtidos na análise das ilhotas pancreáticas, que os tratamentos analisados não tiveram efeito significativo quanto à morfometria destas durante o período experimental do estudo, ou seja, não induziram a regeneração do pâncreas endócrino em ratos diabéticos após um mês de administração.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro concedido pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por meio de bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

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

ATANGWHO, I. J.; EBONG, P. E.; EYONG, E. U.; ETENG, M. U. Combined administration of extracts of

Vernonia amygdalina (Del) and *Azadirachta indica* (A. Juss) mimic insulin in time-course body weight and glucose regulation in diabetic and non diabetic rats. **Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, n.1, p.44-49, 2010.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1052p.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v.82, n.11, p.1336-1345, 2002.

CARVALHO, A. C. **Efeitos da Administração da Arnica montana (tintura-mãe e preparações UHD) na atividade de diferentes agentes flogísticos em ratos**. 2000. Dissertação (mestrado em medicina veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista – UNIP, São Paulo, 2000.

CHANDRA, A.; MAHDJA, A. A.; SINGHA, R. K. Indian herbs result in hypoglycemic responses in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v.27, n.3, p.161-168, 2007.

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

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

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 528p.

EBONG, P. E.; ATANGWHO, I. J.; EYONG, U. E.; EGBUNG, G. E. The antidiabetic efficacy of combined extracts from two continental plants: *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) and *Vernonia amygdalina* (Del.) (African Bitter Leaf). **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.4, n.3, p.239-244, 2008.

FARMACOPÉIA homeopática brasileira. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

FURLAN, M. M. D. P. A estreptozotocina como agente diabético. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v.5, n.2, p.197-201, 2001.

GUPTA, S.; KATARIA, M.; GUPTA, P. K.; MURGANANDAN, S.; YASHROY, R. C. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by

- streptozotocin in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.2-3, p.185-189, 2004.
- HUSSAIN, H. E. M. A. Reversal of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using traditional Indian anti-diabetic plant, *Azadirachta indica* (L.). **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.17, n.2, p.115-123, 2002.
- JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. 725p.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- KHOSLA, P.; BHANWRA, S.; SINGH, J.; SETH, S.; SRIVASTAVA, R. K. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.44, n.1, p.69-74, 2000.
- KING, E. J. & GARNER, R. J. Colorimetric determination of glucose. **Journal of Clinical Pathology**, v.1, n.1, p.30-33, 1947.
- KOSSAK-ROMANACH, A. **Homeopatia em 1000 conceitos**. 3.ed. São Paulo: Elcid, 2003. 561p.
- KUMARI, D. J. Hypoglycaemic effect of moringa oleifera and *Azadirachta indica* in type 2 diabetes mellitus. **The Bioscan**, v.5, n.2, p.211-214, 2010.
- MAHDI, A. A.; CHANDRA, A.; SINGH, R. K.; SHUKLA, S.; MISHRA, L. C.; AHMAD, S. Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.18, n.2, p.8-15, 2003.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. Review. **Phytomedicine**, Kusterdingen, v.2, n.2, p.137-189, 1995.
- MOSTOFA, M.; CHOUDHURY, M. E.; HOSSAIN, M. A.; ISLAM, M. Z.; ISLAM, M. S.; SUMON, M. H. Antidiabetic effects of *catharanthus roseus*, *Azadirachta indica*, *allium Sativum* and glimepiride in experimentally diabetic induced rat. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v.5, n.1-2, p.99-102, 2007.
- PARSHAD, O.; WEST, E.; GARDNER, M. Effects of aqueous extract of neem (*azadirachta indica* a. juss) on streptozotocin induced diabetic rats. In: ANNUAL RESEARCH CONFERENCE, 8., 1999, Kingston. **Eighth Annual Research Conference 1999**. Mona: University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences, 1999.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14.ed. Piracicaba: Pimentel Gomes, 2000. 477p.
- RAGASA, C. Y.; NACPIL, A. D.; NATIVIDAD, G. M.; TADA, M.; COLL, J. C.; RIDEOUT, J. A. Tetrarortriterpenoids from *Azadirachta indica*, *A. Juss.* **Phytochemistry**, v.46, n.3, p.555-558, 1997.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904p.
- ROSA, M. F.; PACHECO, M. R.; GIRARDI, A. M.; SILVA, M. H. M.; SANTOS, E.; BARALDI ARTONI, S. M. Determinação da ação hipoglicemiante da *Azadirachta indica*, *A. Juss* (Neem) aclimatada no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 8 n. 15, julho 2010. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria/artigos/ANOIIIIE_D15ART07.pdf>. Acesso em: 16 de setembro de 2010.
- SANTOS, E. Action hypoglycémiant de l'alloxane 6CH sur les rats diabétiques alloxaniques. **Homeopathie**, v.3, p.38-39, 1990.
- SAXENA, R. C. Scope of Nim for developing countries. In: **World Nim Conference Souvenir**, Feb. 24-28, Bangalore, p.30-36, 1993.
- SCHOSSLER, D. R. C.; MAZZANTI, C. M.; LUZ, S. C. A.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; SILVEIRA, A. F.; CECIM, M. Alterações histológicas e imunoistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1821-1825, 2004.
- TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G.; BEHMER, O. A.; RODRIGUES, C. J. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ed. São Paulo: Manole, 2003. 331p.
- VAN WIJK, R.; CLAUSEN, J.; ALBRECHT, H. The rat in Basic therapeutic research in homeopathy. **Homeopathy**, v.98, p.280-286, 2009.
- WAHEED, A.; MIANA, G. A.; AHMAD, S. I. Clinical investigation of hypoglycemic effect of seeds of *Azadirachta indica* in type-2 (NIDDM) diabetes mellitus. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.19, n.4, p.322-325, 2006.